



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS 1236C>T,
2677G>T/A E 3435C>T DO GENE ABCB1 NA RESPOSTA AO
TRATAMENTO COM CLOZAPINA**

AYDA LUZ MALAVER SALAMANCA

GOIÂNIA-GO

2015

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

| | | | |
|--|--|------------------------------|--|
| Autor (a): | Ayda Luz Malaver Salamanca | | |
| E-mail: | aydamalaver@gmail.com | | |
| Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? | <input checked="" type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | |
| Vínculo empregatício do autor | | | |
| Agência de fomento: | | Sigla: | |
| País: | | UF: | |
| | | CNPJ: | |
| Título: | Análise da influência dos Polimorfismos 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T do gene ABCB1 na Resposta ao tratamento com clozapina | | |
| Palavras-chave: | Farmacogenética, ABCB1, polimorfismos, clozapina, refratáriedade | | |
| Título em outra língua: | Multidrug resistance (MDR1) gene polymorphism are not associated with clozapine response | | |
| Palavras-chave em outra língua: | Pharmacogenetics, ABCB1, Polymorphism, Clozapine, Refractoriness | | |
| Área de concentração: | Biologia celular e molecular | | |
| Data defesa: (dd/mm/aaaa) | 04/12/2015 | | |
| Programa de Pós-Graduação: | Biologia | | |
| Orientador (a): | Paulo César Ghedini | | |
| E-mail: | pcghedini@gmail.com | | |
| Co-orientador (a):* | Rodrigo da Silva Santos | | |
| E-mail: | rdssantos@gmail.com | | |

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Ayda Luz Malaver Salamanca
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 07 / 12 / 2015

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

AYDA LUZ MALAVER SALAMANCA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS 1236C>T,
2677G>T/A E 3435C>T DO GENE ABCB1 NA RESPOSTA AO
TRATAMENTO COM CLOZAPINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ghedini

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo da S. Santos

GOIÂNIA-GO

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Salamanca, Ayda Luz Malaver
Análise da influência dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>T/A e
3435C>T do gene ABCB1 na resposta ao tratamento com clozapina
[manuscrito] / Ayda Luz Malaver Salamanca. - 2015.
LX, 60 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ghedini; co-orientador Dr.
Rodrigo da Silva Santos.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB) , Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2015.

Bibliografia.

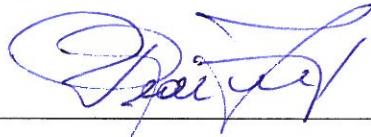
Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Farmacogenética. 2. ABCB1. 3. Polimorfismos. 4. Clozapina. 5.
Refratáriedade. I. Ghedini, Paulo César , orient. II. Santos, Rodrigo
da Silva, co-orient. III. Título.

AYDA LUZ MALAVER SALAMANCA

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS 1236C>T,
2677G>T/A E 3435C>T DO GENE ABCB1 NA RESPOSTA AO
TRATAMENTO COM CLOZAPINA

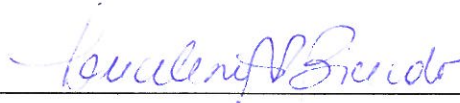
' BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Paulo César Ghedini
Universidade Federal de Goiás - UFG



Prof. Dr. Rodrigo Bernini de Brito
Brain Institute



Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo
Universidade Federal de Goiás – UFG



Prof. Dr. Rodrigo da Silva Santos
Universidade Federal de Goiás – UFG

Aprovada em: 04 / 12 / 2015

A verdadeira viagem de descobrimento, não consiste em procurar novas paisagens, mas sim em ter novos olhos.

Marcel Proust

Dedicat3ria

Dedicado a la memoria de mi padre, Don Juan Nepomuceno Malaver, claro que s3, no podr3a ser de otra manera, dedicado a mi querido viejo, a mi padre que me acompa1a desde la inmensidad del cielo, s3 que de estar conmigo soltar3as una lagr3ma de alegr3a al ver que te tengo presente en cada uno de los pasos de vida, te amo papa y este trabajo al igual que muchos otros que hice y que hare fueron y ser3an en tu memoria, mi querido viejo, en la simplicidad de estas palabras siempre agradecida por tu esfuerzo, dedicaci3n y sacrificio para ayudarme a encontrar mi camino.

Agradecimentos

Agradecer em primeiro lugar a Deus que me mostra sua presença nos momentos de fraqueza, fortalecendo meu espírito.

A minha mãe amada, minha Cecilia, minha amiga, minha confidente, não teria palavras suficientes para agradecer-te, as constantes palavras de força, o constante amor, grata mãe minha por te ter a meu lado, nenhum homenagem seria suficiente para te demonstrar toda minha gratidão.

A meus irmãos a minha Leidy e meu Andrés, que sempre me apoiaram neste desafio, quem sempre tenho presentes entre minhas mais belas memórias de criança, os amo.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas que me ofereceu a oportunidade de amadurecer meu nível profissional, e que me deu a oportunidade de conhecer este país e esta gente maravilhosa.

A meu orientador Prof. Dr. Paulo Ghedini, que me abriu as portas de seu laboratório e de seu grupo de pesquisa, que deu-me o voto de confiança e permitiu avançar em meus conhecimentos, além disso agradeço por ser um apoio em momentos de dificuldade, me oferecendo sua constante ajuda.

A meu coorientador Prof. Dr. Rodrigo Santos, pela sua dedicação. A Profa. Dra. Aline Helena que me orientou na parte técnica do trabalho, ao Dr. Rodrigo Bernini quem me orientou na parte clínica da pesquisa, ao Me. Leandro Prado quem me orientou nas análises populacionais.

A meus amigos que estiveram comigo, a Andrés Osorio por me incentivar em fazer o mestrado no Brasil, meus mais sinceros agradecimentos sem seu apoio não haveria iniciado esta aventura, sempre grata á você; a minhas amigas Liz Romero e Claudia

Muñoz que me escutaram, me apoiaram e me deram força em meus momentos de maior fraqueza, obrigada” chicas” de meu coração.

Agradecimentos especiais a meus queridos Renan Oliveira, Andrés Medina, Fernando Zuñiga e Tito Castiblanco, que abriram-me as portas de uma casa, minha casa do Brasil um local onde me senti acolhida, apoiada e querida, obrigada por me suportar, me escutar e me aconselhar.

A meus queridos amigos do laboratório, claro que sim não podiam faltar, a minhas queridas Luanna Fernandes, Rayane Mendes, Lais Moraes, se converteram em boas amigas, sempre estarão em mim, a meus queridos Lenin Moral, Thiago Sardinha e Agostinho Semedo, amigos de coração, obrigada pelos momentos de risos e descontração.

Aos meninos de iniciação científica, Bruna, Frederico, Jeovino e Amanda

À CAPES, CNPq e FAPEG pelo incentivo através da bolsa e auxílios à pesquisa.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | X |
| LISTA DE FIGURAS | XI |
| LISTA DE TABELAS | XII |
| RESUMO..... | XIII |
| ABSTRACT | XIV |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Esquizofrenia..... | 1 |
| 1.2. Antipsicóticos e Clozapina..... | 2 |
| 1.2.1. Efeitos colaterais da CLZ | 7 |
| 1.2.2. Resistência ao tratamento com CLZ | 7 |
| 1.3. ABCB1..... | 9 |
| 1.3.1. Generalidades | 9 |
| 1.3.2. Substratos, inibidores e indutores de ABCB1..... | 10 |
| 1.3.3. Polimorfismos e fármaco resistência..... | 11 |
| 1.3.4. Variação étnica das frequências polimórficas | 14 |
| 2. Objetivos | 17 |
| 2.1. Geral..... | 17 |
| 2.2. Específicos | 17 |
| 3. Metodologia..... | 18 |
| 3.1. Pacientes..... | 18 |
| 3.2. Análise farmacogenética | 19 |
| 3.2.1. Extração de DNA..... | 19 |
| 3.2.2. PCR..... | 20 |
| 3.2.3. Sequenciamento | 21 |
| 3.3. Análise estatística | 23 |
| 4. Resultados | 24 |
| 4.1. Frequências alélicas, genótípicas, equilíbrio de HW e desequilíbrio de ligação..... | 24 |
| 4.2. Associação entre polimorfismos e a resposta terapêutica à CLZ..... | 26 |

| | |
|---|----|
| 4.3 Análise dos haplótipos..... | 28 |
| 4.4. Análise dos dados clínicos e sócio-demográficos em pacientes refratários e super-refratários | 30 |
| 4.5. CLZ e ganho de peso | 33 |
| 5. Discussão..... | 34 |
| 6. Conclusões..... | 39 |
| 7. Referências bibliográficas | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|---|
| CLZ | Clozapina |
| SQZ | Esquizofrenia |
| 5HT2A | Receptor de serotonina 5-hidroxytriptamina |
| APGs | Antipsicóticos de primeira geração |
| ASGs | Antipsicóticos de segunda geração |
| EPS | Sintomas extrapiramidais |
| SNP | Polimorfismo de nucleotídeo simple |
| ER | Esquizofrenia refratária |
| SER | Esquizofrenia super refratária |
| MDR1 | Multidrug resistance |
| ABCB1 | ATP binding cassette |
| P-gp | Glicoproteína P |
| TMD | Domínio transmembranal |
| ABD | ATP binding domain |
| DSM IV-TR | Diagnostic and Stastical Manual of Mental Disorders |
| BPRS | Brief Rating Scale- Escada breve de sintomas |
| HW | Hardy-Weinberg |
| D' | Coeficiente de Lewontin |
| EM | Algoritmo de máxima verossimilhança |
| IMC | Índice de massa corporal |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.Representação esquemática dos receptores de ligação à CLZ, mecanismo de ação (agonismo/antagonismo/agonismo parcial) e afinidade de ligação aos receptores. | 5 |
| Figura 2.Representação esquemática da proteína ABCB1..... | 10 |
| Figura 3.Representação esquemática do gene MDR1..... | 12 |
| Figura 4.Eletroferograma do polimorfismo 1236C>T. | 22 |
| Figura 5.Eletroferograma do polimorfismo 2677G>A/T..... | 22 |
| Figura 6.Eletroferograma do polimorfismo 3435C>T | 22 |
| Figura 7.Desequilíbrio de ligação estimado pelo coeficiente de Lewontin (D') entre os polimorfismos 1236C>T, 2677G>A/T, 3435C/T. | 25 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Fármacos que potencializam ou interferem no metabolismo da CYP1A2..... | 6 |
| Tabela 2. Fármacos que inibem ou induzem a ação de ABCB1. | 11 |
| Tabela 3. Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>A/T e 3435C/T em diferentes populações do mundo..... | 15 |
| Tabela 4. Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>A/T e 3435C/T, no Brasil..... | 16 |
| Tabela 5. Características sócio demográficas dos pacientes..... | 19 |
| Tabela 6. Iniciadores dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>A/T, 3435C>T. | 20 |
| Tabela 7. Condições da reação de PCR..... | 20 |
| Tabela 8. Condições da reação de sequenciamento..... | 21 |
| Tabela 9. Frequências alélicas e genótípicas e equilíbrio de Hardy- Weinberg (EHW). . | 25 |
| Tabela 10. Relação entre os polimorfismos de ABCB1 e a dosagem de CLZ (mg/dia). . | 26 |
| Tabela 11. Relação entre os polimorfismos de ABCB1 com a porcentagem (%) de variação da pontuação na escala BPRS. | 27 |
| Tabela 12. Relação entre os polimorfismos de ABCB1 e grupos de pacientes refratário e super refratário. | 28 |
| Tabela 13. Frequências haplotípicas..... | 29 |
| Tabela 14. Relação entre o haplótipo e a dosagem de CLZ, % de variação da BPRS e a refratariedade ao tratamento. | 29 |
| Tabela 15. Características clínicas e sócio demográficas dos pacientes portadores de esquizofrenia refratária (ER) e super refratária (ESR). | 30 |
| Tabela 16. Associação das características sócio demográficas com a dosagem de CLZ (mg/dia) e a % de variação da BPRS..... | 31 |
| Tabela 17. Distribuição alélica e genotípica nos grupos étnicos. | 32 |

RESUMO

Clozapina (CLZ) é um antipsicótico de segunda geração, indicada no tratamento de esquizofrenia refratária (ER). Apesar de ser o fármaco de escolha nestes pacientes, 30% deles não respondem satisfatoriamente à terapia com CLZ, constituindo o grupo de indivíduos portadores de esquizofrenia super-refratária (ESR). A variabilidade na resposta ao tratamento com CLZ pode estar relacionada a alterações na farmacocinética da CLZ influenciadas pelos polimorfismos 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T do gene ABCB1. ABCB1 é uma proteína transportadora de membrana, que promove a passagem de fármacos do meio intra ao extracelular. Os polimorfismos de ABCB1 podem causar mudanças estruturais ou na expressão proteica, influenciando nas concentrações intracelulares de CLZ e contribuindo para o sucesso ou o fracasso da terapia. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a associação entre os polimorfismos 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T de ABCB1 com a resposta ao tratamento à CLZ. Um total de 68 pacientes em uso de CLZ, 34 portadores de ER e 34 de ESR, foram incluídos no estudo. Os testes de genotipagem foram realizados através da extração do DNA genômico, PCR e sequenciamento. Não foi observada diferença na distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos de ABCB1, entre os grupos ER e ESR, assim mesmo não foi observada relação entre os polimorfismos estudados com a dosagem de CLZ e a gravidade psicopatológica avaliados pela escala BPRS. Fatores como consumo de café, cigarro, idade e etnia não influenciam na resposta ao tratamento com a CLZ. Foi evidenciada maior presença de pacientes do gênero feminino no grupo ESR em relação ao grupo ER e maior presença de indivíduos do gênero masculino no grupo ER quando comparado com o grupo ESR. O conjunto dos resultados aqui obtidos demonstram que não há associação entre os polimorfismos 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T do gene ABCB1 com a refratariedade ao tratamento com CLZ.

Palavras chaves: Farmacogenética, ABCB1, polimorfismos, clozapina, refratário, super refratário

ABSTRACT

Clozapine (CLZ) is the antipsychotic drug of choice in treatment refractory schizophrenia (TRS), however 30% of the patients with TRS don't have full response to treatment with CLZ, these patients are considered to have super refractory schizophrenia (SRS). The response variability to treatment with CLZ may be associated with alterations of the CLZ plasma levels promoted by 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T ABCB1 gene polymorphisms. ABCB1 is a transmembrane glycoprotein of transport, which export drugs from the intracellular to the extracellular space. ABCB1 polymorphisms cause structurally and functional protein changes that influence the intracellular CLZ levels and, consequently, promoting therapy failure. This work had the aim to establish the relation between the 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T ABCB1 polymorphisms and the CLZ treatment response. This study included a total of 68 patients, 34 of whom were classified as TRS (CLZ responders) and 34 as SRS (CLZ non-responders). All patients were in use of CLZ for at least one year. For the genotype test was extracted genomic DNA, following for PCR and sequencing techniques. It was not observed any differences in allelic and genotype distribution between 1236C>T, 2677G>T/A and 3435C>T polymorphisms between RS and SRS groups. The polymorphisms not influenced the CLZ dose level, and percentage of BPRS change. In the same way, the results not showed relation between age, coffee intake, smoking behaviors and ethnicity and the CLZ treatment response, however, was evidenced a higher proportion of female patients in the SRS group when compared with the TRS group. In opposite, a lower proportion of male patients was observed in the SRS than the TRS group. Taken together, the results here obtained showed no association between 12361236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T polymorphisms of ABCB1 gene and failure to CLZ treatment.

Key Words: Pharmacogenetics, ABCB1, polymorphisms, clozapine, refractory, super-refractory

1. Introdução

1.1. Esquizofrenia

A esquizofrenia (SQZ) é um transtorno mental que atinge igualmente homens e mulheres, afeta cerca de 27 milhões de pessoas, apresentando prevalência mundial de 1% (1). É uma doença crônica, caracterizada por alteração de personalidade, diminuição da capacidade cognitiva, isolamento e disfunção social e laboral, maior risco de padecer outras doenças, como doenças cardiovasculares, maior tendência ao suicídio, motivos pelos quais os indivíduos com esquizofrenia possuem expectativa de vida reduzida de 12 a 15 anos em comparação com a média geral da população (1, 2).

A etiologia da doença, ainda não está esclarecida, no entanto sabe-se que indivíduos com SQZ apresentam uma taxa de 15% de probabilidade de transmiti-la a seus filhos (3), sendo assim evidente a participação genética na esquizofrenia. Não são conhecidos os genes envolvidos, mas estima-se que a enfermidade pode ser devida a uma alteração multigenética (3), e inclusive epigenética (4). Por outro lado, a exposição a fatores exógenos como infecções virais, hipóxia e má nutrição durante o desenvolvimento fetal, também parecem influenciar no surgimento da doença (5).

Os sintomas da enfermidade são classificados como sintomas positivos, negativos e cognitivos (2). Os positivos são caracterizados por delírios, alucinações, linguagem e comportamento desorganizado, onde pode ser observado a repetição contínua de movimentos ou então a diminuição dos mesmos. Os sintomas negativos são facilmente confundidos com a depressão e se apresentam como embotamento afetivo, falta de motivação, dificuldade para fazer atividades de rotina, falta de cuidados com a higiene pessoal, anedonia, dificuldades em manter uma conversa e comunicar-se. Os sintomas cognitivos são caracterizados pela deficiência na compreensão, concentração, memorização e para a execução de tarefas (6).

A fisiopatologia da esquizofrenia é caracterizada por um desequilíbrio de neurotransmissores a nível cerebral envolvendo dopamina, glutamato, GABA e serotonina que, junto a seus receptores, parecem estar implicados na complexidade da doença, a partir dessas observações originaram-se várias hipóteses para explicar a etiologia da esquizofrenia.

A hipótese dopaminérgica é mais antiga, foi proposta por Carlson em 1970 e fundamenta-se na observação de que substâncias psicoativas, agonistas de receptores dopaminérgicos, como a cocaína e as anfetaminas, geram comportamento semelhante aos sintomas positivos da esquizofrenia (7). O esclarecimento de que antipsicóticos tem como alvo o receptor de dopamina D2, demonstrou que esse neurotransmissor possui participação na fisiopatologia da esquizofrenia (8). Laurelle et al. (2003) (9), ratificaram a hiperfunção dopaminérgica na via mesolímbica e que a interação com os receptores D2 seriam os responsáveis pelos sintomas positivos. Além disso, explicaram que os sintomas negativos podem ser ocasionados pela hipofunção dopaminérgica na via mesocortical, o qual conduziria a uma ativação ineficiente dos receptores D1, que cumprem uma função excitatória.

Na SQZ, além do desequilíbrio dopaminérgico, também coexistem alterações em outros sistemas de neurotransmissores. Há pelo menos outras três hipóteses que tentam explicar a sintomatologia da doença: glutaminérgica, gabaminérgica e serotoninérgica. A hipótese glutaminérgica fundamenta-se no fato de que algumas substâncias como a fenciclidina (PCP), um antagonista de glutamato, são capazes de interagir com o receptor N-methyl D- aspartate (NMDA) e gerar sintomas semelhantes aos da SQZ (10). A hipótese gabaminérgica fundamenta-se em estudos realizados em cérebros de indivíduos esquizofrênicos *post mortem*, onde foi observado que os neurônios relacionados com a neurotransmissão do ácido gama-aminobutírico (GABA) estavam reduzidos, sugerindo assim uma diminuição da transmissão do GABA na SQZ (11). Outra hipótese relacionada é a serotoninérgica, a qual fundamenta-se no fato de que a maioria dos antipsicóticos atípicos tem como alvo o receptor de serotonina 5HT2A (do inglês *5-hydroxytryptamine*) e de que cérebros de pacientes esquizofrênicos analisados *post-mortem* apresentam diminuição de receptores 5HT2A (12).

1.2. Antipsicóticos e Clozapina

Os antipsicóticos são o tratamento de escolha para a esquizofrenia e são classificados como típicos ou de primeira geração (APGs) e atípicos ou de segunda geração (ASGs). Os APGs foram descobertos em 1950, sendo a clorpromazina e o

haloperidol os fármacos mais conhecidos desse grupo. O principal alvo dos APGs é o receptor D2 de dopamina.

Os APGs estão associados com a produção de sintomas extrapiramidais (SEP) (13). Os SEP surgem da desregulação do sistema extrapiramidal, que é uma rede neuronal que faz o controle dos movimentos musculares voluntários (14). Uma ocupação entre 70% e 80% dos receptores alvos por parte dos antipsicóticos geram boas repostas terapêuticas, uma ocupação em mais de 80% dos receptores gera efeitos característicos do SEP (15). Os SEP mais comuns são:

Síndrome parkinsoniana (ou pseudoparkinsonismo): Apresenta similaridade com os sintomas da doença de Parkinson, caracteriza-se por diminuição da expressão facial, rigidez articular, salivação, escritura pequena (micrografia) e tremores;

Acinesia: caracteriza-se pela diminuição motora, parecendo que os pacientes ficam imóveis, assemelhando-se aos sintomas negativos da esquizofrenia;

Discinesia: refere-se a um amplo grupo de movimentos anormais involuntários que inclui coreia, atetose, distonia, acatisia, movimentos compulsivos, tics, entre outros. As discinesias dividem-se em agudas e tardias, dependendo do tempo de início dos sintomas. As agudas aparecem depois da administração do neuroléptico (2-24 h), e a discinesia tardia surge no tratamento crônico, sendo que 75% dos pacientes medicados com APGs apresentam SEP (13).

Os ASGs surgiram em 1970 com a introdução da clozapina (CLZ) (16) e atualmente são conhecidos ao redor de 15 diferentes ASGs, entre os quais sobressaem a olanzapina, quetiapina, ziprasidona, aripiprazol e risperidona. CLZ foi retirada do mercado em 1975 por ser associada com agranulocitose e a morte de 8 pacientes na Finlândia. Posteriormente, em 1989, foi demonstrado que a CLZ é o tratamento mais efetivo da SQZ, motivo pelo qual a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou seu reingresso no mercado para o uso exclusivo em casos de esquizofrenia refratária (ER) e, em 2002, aprovou também seu uso em pacientes esquizofrênicos com tendências suicidas, persistência de hostilidade e agressividade (16).

CLZ é uma benzodiazepina tricíclica de baixo peso molecular (326,82 g/mol), a qual apresenta taxa de absorção entre 90–95% e alcança o pico máximo no plasma duas horas após a administração. Possui vida média de 12 horas e 50 % dos metabólitos são

excretados na urina e 30% nas fezes (17). Seu metabolismo é realizado primariamente pelo sistema enzimático do citocromo oxidase P450 (CYP450), sendo as principais isoenzimas metabolizadoras CYP1A2, CYP3A4, CYP2C19 e CYP2D6. Além disso, agentes capazes de induzir ou inibir a CYP450 podem influenciar no metabolismo da CLZ (16)

Os principais metabólitos da CLZ são a N-desmetil clozapina (norclozapina), produto da N- desmetilação realizada pela CYP1A2, e o N-óxido de clozapina, produto da N- oxidação realizada pela CYP3A4. A norclozapina é o metabólito mais importante, sendo o único metabólito que mostra atividade significativa, exibindo um perfil semelhante ao da CLZ (16).

Farmacodinamicamente, a CLZ é capaz de se unir a receptores tanto inibitórios como excitatórios de vários neurotransmissores, sendo que sua ação pode ser do tipo agonista ou antagonista e seus principais alvos são os receptores de dopamina e serotonina. A CLZ é antagonista parcial do receptor D2 (inibitório), apresentando menor afinidade a estes receptores quando comparada aos APGs, o que poderia explicar a reduzida quantidade de SEP gerados pela CLZ em comparação com os APGs. Além dos receptores D2, a CLZ é agonista parcial do receptor dopaminérgico D1 (excitatório), antagonista dos receptores de serotonina 5HT_{2A/2C} (excitatórios), agonista parcial do receptor 5HT_{1A} de serotonina (receptor auto-inibitório), agonista dos receptores colinérgicos muscarínicos M1 e M3 (excitatórios), agonista parcial dos receptores M2 e M4 (inibitórios), antagonista dos receptores adrenérgicos α -1 (excitatório) e α -2 (inibitório), e é um forte antagonista do receptor de histamina H1 (excitatório) (11). A CLZ também é inibidora do sistema de transporte de aminoácidos SNAT1, permitindo que vários aminoácidos fiquem livres no espaço cerebral, sendo que a glicina apresenta a maior biodisponibilidade, potencializando a ativação do NMDA (18). A hipoatividade do NMDA faz parte da teoria glutaminérgica envolvida com o surgimento da SQZ (18). O perfil de ligação da CLZ aos diferentes receptores e o grau de afinidade é representado na figura 1.

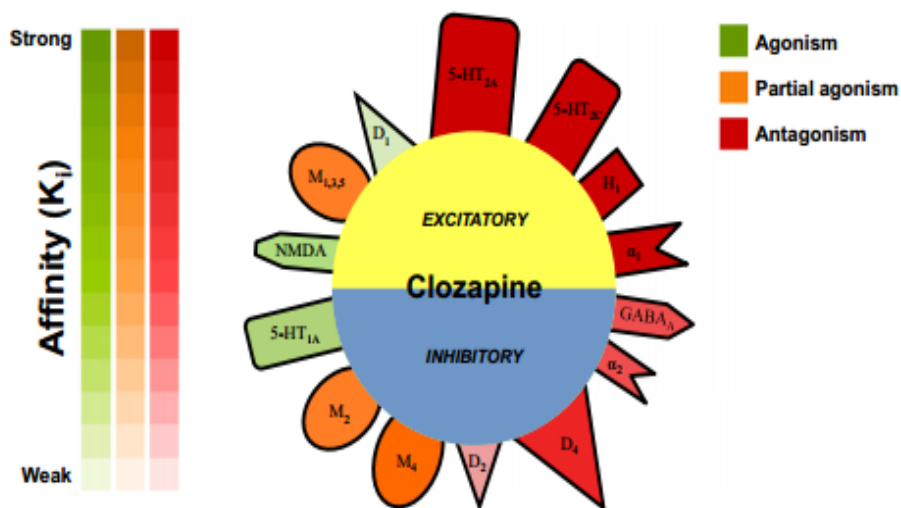


Figura 1. Representação esquemática dos receptores de ligação à CLZ, mecanismo de ação (agonismo/antagonismo/agonismo parcial) e afinidade de ligação aos receptores. William T. O'Connor e Sean D. O'Shea (2015). (11)

Fatores genéticos e não genéticos (19) podem interferir no metabolismo e na biodisponibilidade e, portanto, na ação farmacológica da CLZ. Entre os fatores genéticos que afetam o metabolismo de CLZ, estão os polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs, do inglês *single single nucleotide polymorphisms*) presentes nos genes que codificam proteínas de receptores alvo da CLZ, ou em genes que intervêm no metabolismo ou no transporte da CLZ. Na área da farmacogenética, diversos estudos tem procurado estabelecer a relação entre os polimorfismos genéticos e a resposta ao tratamento. No caso da CLZ, os estudos baseiam-se nos polimorfismos presentes nos genes dos receptores de dopamina, serotonina, das enzimas CYP1A2 e CYP3A4 (20) e, mais recentemente, no gene da proteína transportadora ABCB1 (21). Por outro lado, tem-se os fatores não genéticos que podem interferir na resposta ao tratamento, tais como:

- Presença de outra doença que afete órgãos vitais como os rins ou fígado.
- Idade e gênero: Apesar de controverso, Lane et al. (1999) (22), demonstraram que indivíduos idosos apresentam resposta diminuída à CLZ enquanto Tang et al. (2007) (23), observaram maiores concentrações de CLZ em mulheres do que em homens

- Interações medicamentosas: Diferentes medicamentos são capazes de diminuir ou aumentar a atividade da CYP e, portanto, capazes de interferir na concentração plasmática de CLZ: fluvoxamina inibe a ação de CYP1A2 e CYP3A4, fluoxetina e paroxetina inibem a CYP2D6, macrolídeos como a eritromicina inibem a CYP3A4, ciprofloxacina inibe a síntese de CYP3A4, fenobarbital, carbamazepina e rifampicina induzem a CYP3A4, omeprazol induz a atividade de CYP1A2 (24). A tabela 1 apresenta exemplos de fármacos que podem interferir na concentração plasmática da CLZ ao influenciarem a atividade enzimática da CYP1A2.

Tabela 1. Fármacos que potencializam ou interferem no metabolismo da CYP1A2.

| Fármacos que inibem o metabolismo da CYP/ Aumento da concentração da CLZ | Fármacos que estimulam o metabolismo da CYP/ Diminuição da concentração de CLZ |
|---|---|
| Fluvoxamina | |
| Fluoxetina | |
| Norfluoxetina | |
| Nefazodona | Fenobarbital |
| Eritromicina | Carbamazepina |
| Ciprofloxacina | Rifampicina |
| Cetoconazol | Omeprazol |
| Quinidina | Fenitoína |
| Varfarina | |
| Ritonavir | |
| Isoniazida | |

- Cafeína: A cafeína, semelhante à CLZ, é substrato da CYP1A2, e atua competindo pelo sítio de clivagem da enzima. Hagg et al. (2000) (25), reportaram que a ingestão diária de cafeína em doses de 400 a 1000 mg, inibem o metabolismo e a eliminação de CLZ. Essa relação entre cafeína e metabolismo de CLZ foi também encontrada no trabalho de Spina et al.,(2007) (24). Por outro lado, autores como

Djordjevic et al. (2008) (26), encontraram que o consumo de café influencia no aumento do metabolismo da CLZ.

- Nicotina: É um indutor de CYP1A2. Hasegawa et al. (1993) (27) descreveram a presença de maiores concentrações de CLZ plasmática em pacientes não fumantes em comparação com pacientes fumantes. Meyer et al. (2001) (28) relataram o aumento da concentração de CLZ em pacientes fumantes que deixaram de fumar e com o surgimento de efeitos colaterais sendo, por essa razão, aconselhado ajustar a dosagem de CLZ dependendo do perfil do paciente (fumante crônico, fumante esporádico, paciente que está deixando de fumar) (29).

1.2.1. Efeitos colaterais da CLZ

CLZ está associada com efeitos colaterais como agranulocitose (motivo pelo qual é indispensável o controle periódico dos níveis de leucócitos), com o desenvolvimento de síndrome metabólica (ganho de peso, diabetes, problemas cardiovasculares) (30) também está relacionada com sedação e prolongamento do intervalo QT (31). Fatores genéticos e não genéticos interferem na concentração plasmática de CLZ e influenciam diretamente na incidência dos efeitos colaterais, sendo, portanto, importante a identificação desses fatores para auxiliar no ajuste de doses e evitar a ocorrência de efeitos adversos.

1.2.2. Resistência ao tratamento com CLZ

A resistência ao tratamento se caracteriza pela não redução dos sintomas com o tratamento medicamentoso, no entanto, antes deve-se distinguir entre a resistência verdadeira e a pseudo-resistência. Teoricamente, considera-se resistência verdadeira à falta de ação do medicamento em seu alvo ou a baixa sensibilidade do receptor ao fármaco (15), enquanto a pseudo-resistência é definida como a não resposta ao tratamento por fatores não relacionados com o receptor do fármaco (15). Alguns dos fatores associados à pseudo-resistência são:

- Enfermidades do fígado, rins ou outra doença que afete algum órgão que está relacionado com o metabolismo de fármacos.

- Não aderência ao tratamento: é quando o paciente não administra os antipsicóticos na dosagem e nos intervalos de tempo recomendados.
- Dosagem insuficiente: a dosagem de antipsicótico não é suficiente para promover o efeito terapêutico no paciente.
- Aumento do metabolismo ou de qualquer outro sistema fisiológico que gere diminuição da concentração sanguínea do fármaco.

A distinção entre resistência e pseudo-resistência pode ser determinada pela avaliação das concentrações plasmáticas do fármaco, esperando-se valores normais na resistência e valores diminuídos ou alterados no caso da pseudo-resistência, embora esta condição não seja totalmente segura, uma vez que fatores fisiológicos como a idade, o sexo e o consumo de certos alimentos podem alterar também as concentrações sanguíneas da substância e dificultar a distinção entre resistência verdadeira e pseudo-resistência. Por esse motivo e em termos práticos, a pseudo-resistência e a resistência verdadeira são definidas de maneira geral como resistência ao tratamento.(15).

Antes de diagnosticar um indivíduo com SQZ refratária (ER), deve-se avaliar alguns fatores que podem influenciar no diagnóstico errado como, por exemplo, se o paciente realmente tem SQZ ou outra doença psiquiátrica, se o paciente apresenta aderência ao tratamento, se a dosagem é adequada, se existe outra doença concomitante, se há a presença de fatores externos como o cigarro e outros que influenciam negativamente na resposta ao tratamento (32). Segundo a *Schizophrenia Algorithm* da *International Psychopharmacology Algorithm Project*, paciente ER é definido como aquele que não responde a dois ensaios clínicos de quatro a seis semanas de duração em monoterapia com dois diferentes ASGs ou a dois ensaios com APGs, se não estiverem disponíveis ASGs (33) Pacientes que atendem aos critérios de ER são tratados com CLZ em dosagens que variam entre 300- 900 mg/dia.

A super-refratariedade (ESR) é definida como a ausência de resposta à monoterapia com CLZ por um período de 6 meses (33) sendo que 30% dos pacientes com ER não respondem satisfatoriamente ao tratamento em monoterapia com CLZ (34). Nesses casos são utilizadas estratégias de combinação com outros fármacos, como os ASGs risperidona, aripiprazol e amilsupirida, entre outros, ou a combinação com APGs,

como haloperidol e clorpromazina. Outra estratégia terapêutica é a combinação com fármacos de outras classes, como o lítio, ácido valpróico, benzodiazepínicos, inibidores da recaptação de serotonina (IRS), ou com anticonvulsivantes como a lamotrigina e o topiramato. A terapia eletroconvulsiva (ECT) e a estimulação magnética transcraniana repetitiva, são terapias que também são usadas como coadjuvantes no tratamento da ESR (34, 35).

1.3. ABCB1

1.3.1. Generalidades

ABCB1 é o transportador mais estudado e caracterizado até o momento, devido à importância clínica que lhe é atribuída. Foi descoberto em 1970 por Biedler et al. (36), que observaram a presença de uma proteína de membrana que era capaz de conferir resistência à actinomicina em células de hamsters. Em 1976, Juliano et al. (37), isolaram a P-gp de células de ovário de hamster resistentes à colchicina. Em 1987, Fojo et al. (38) codificaram o cDNA da proteína a partir de células de tumor que apresentavam resistência a múltiplos agentes antineoplásicos, sendo posteriormente identificada a presença da proteína em tecidos normais também (39). A P-gp exerce função protetora, excretando xenobióticos do meio intracelular para o extracelular, sendo sua importância demonstrada em experimentos com animais, onde a mesma reduziu os efeitos tóxicos de medicamentos (39).

A P-gp encontra-se localizada em tecidos e órgãos onde é vital estar livre de tóxicos, como o epitélio da barreira hematoencefálica, placenta, ovários, testículos, e em órgãos que cumprem função de excreção, como a superfície canicular dos hepatócitos, a superfície apical das células tubulares dos rins e a superfície dos enterócitos. Também está presente em macrófagos, células *natural killer*, células dendríticas e linfócitos T e B (40). A localização da P-gp permite inferir sua importância na proteção contra a toxicidade de moléculas endógenas e exógenas, cumprindo função excretora e defensiva e influenciando também na distribuição e eliminação de fármacos.

P-gp é um membro da superfamília que liga-se ao trifosfato de adenosina (ATP), chamada de família ABC (do inglês *ATP-binding cassette* - cassete que liga ATP). Pertence a subfamília B e é considerada o membro número 1 dessa família, do qual

origina a designação ABCB1 (41). É uma proteína transmembrana de 170 Dalton que possui dois domínios transmembranais (TMD do inglês *transmembranal domain*) e dois intracelulares conhecidos como domínios de ligação ao ATP (NBD do inglês *nucleotide binding domain*). Os domínios extracelulares cumprem a função de reconhecimento do substrato e os intracelulares geram energia a partir da defosforilação do ATP a ADP (42), permitindo que a proteína se abra e libere o substrato unido aos TMD (40, 42). A estrutura da proteína está representada na figura 2.

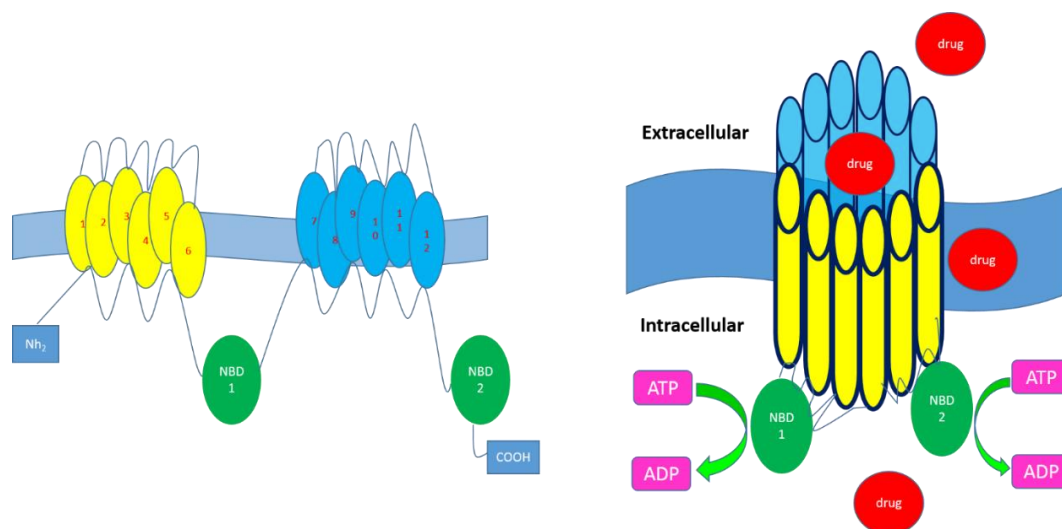


Figura 2. Representação esquemática da proteína ABCB1.

1.3.2. Substratos, inibidores e indutores de ABCB1

Ainda não está esclarecida a estrutura dos substratos de ABCB1, mas sabe-se que a natureza lipofílica e a quantidade de pontes de hidrogênio tem uma participação importante para o reconhecimento do substrato. Entre os vários substratos da P-gp destacam-se a digoxina, talinolol, inibidores de protease como o lopinavir e atazanavir, anti-hipertensivo como a losartana, antidepressivo como a amitriptilina, antibióticos como eritromicina e doxiciclina, entre outros (41, 43). Também são conhecidas drogas que são capazes de potencializar ou inibir a função da P-gp, algumas delas são apresentadas na tabela 2 (40). Dentre os antipsicóticos, sabe-se que a quetiapina, a olanzapina, a CLZ e o metabólito norclozapina são substratos de ABCB1 (44).

Tabela 2. Fármacos que inibem ou induzem a ação de ABCB1.(40)

| Fármaco | Inibidores | Indutores | Fármaco | Inibidores | Indutores |
|--------------------------|------------|-----------|--------------------------|------------|-----------|
| Antihipertensivos | | | Antimicóticos | | |
| Carvedilol | x | | Itraconazol | x | |
| Nicardipina | x | | Ketokonazol | x | |
| Reserpina | x | | Inmunossupresores | | |
| Antihistaminicos | | | Ciclosporina | x | |
| Amiadorona | x | | Antidepressivos | | |
| Profanona | x | | Fluoxetina | x | |
| Quinidina | x | | Paroxetina | x | |
| Verapamil | x | | Neurolépticos | | |
| Glucorticoides | | | Clorpromazina | x | |
| Dexametasona | | x | Flupentizol | x | |
| Antivirales | | | Fenotiazina | | x |
| Amprenavir | | x | Opioides | | |
| Ritonavir | X | X | Metadona | x | |
| Antibióticos | | | Morfina | | x |
| Claritromicina | x | | Outros | | |
| Eritromicina | x | | Ácido retinoico | | x |
| Rifampicina | | x | Progesterona | x | |

1.3.3. Polimorfismos e fármaco resistência

O gene que codifica para a proteína é conhecido como gene de resistência à múltiplas drogas (MDR1) (ResSeq accession NT_007933), que está localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q21.12). O gene tem um comprimento de 209.6 Kb, contém 29 exons, o RNA mensageiro (mRNA) tem 4872 pb (ResSeq accession NM_000927.3) (45) e codifica para uma proteína de 1280 aminoácidos (46). Até a presente data são descritos em torno de 1279 SNPs em todo o gene de ABCB1, entre estes 63 estão na região codificante, 22 são sinônimos e 41 não sinônimos (46). Algumas dessas variantes podem afetar a funcionalidade da proteína, enquanto outras parecem não ter relação. Alguns dos SNPs identificados no gene MDR1 estão representados na figura 3.

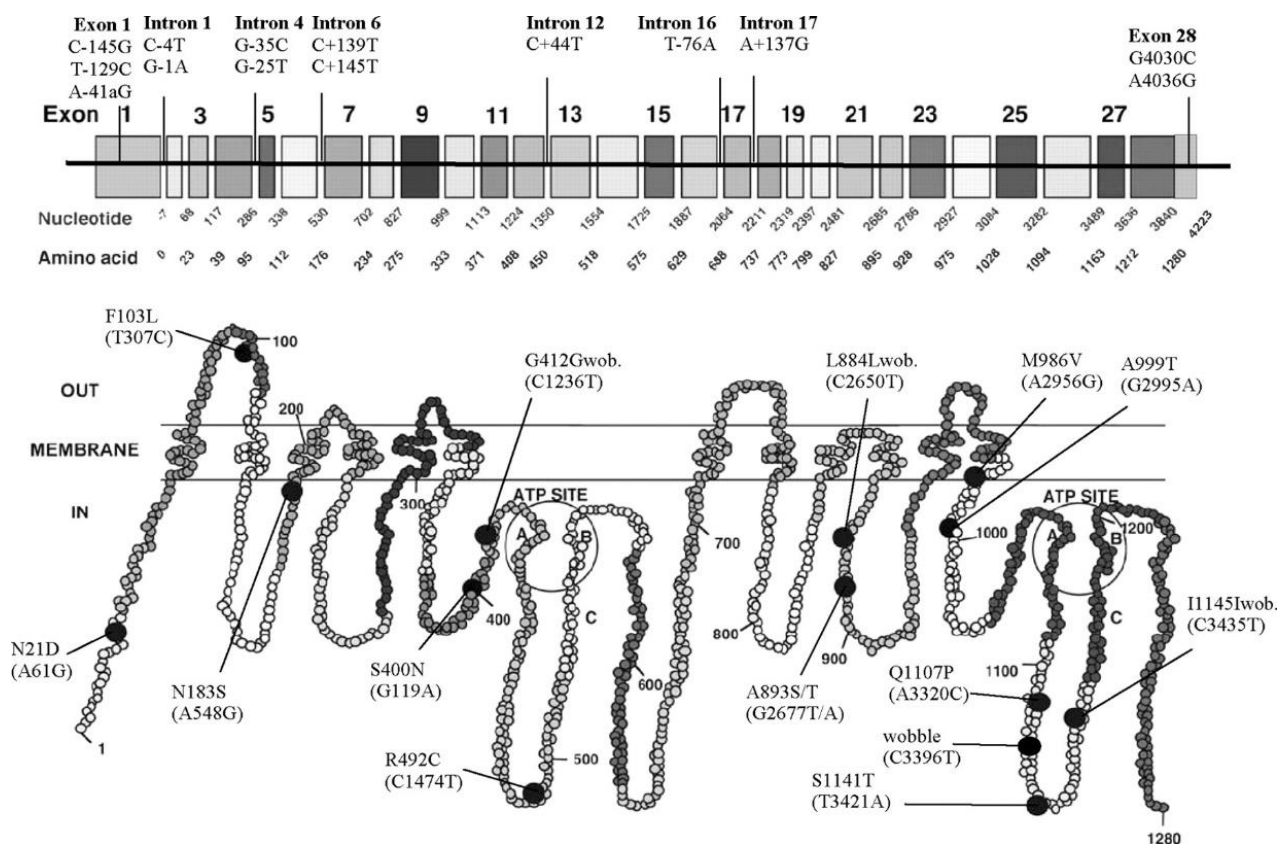


Figura 3. Representação esquemática do gene MDR1. Adaptado de Meletiadis et al. (2006) (47). Na parte superior da figura se observa os 29 exons do gene, o intervalo de nucleotídeos e aminoácidos de cada exon, e na parte inferior a localização dos principais polimorfismos do gen.

Os principais polimorfismos que tem relevância clínica são os polimorfismos 1236 C>T (exon 12, rs1128503, Gly412Gly), 2677 G>A/T (exon 21, rs2032582, Ala893Ser/Thr) e 3435 C>T (exon 26, rs1045642, Ile1145Ile). Vários estudos destes polimorfismos foram realizados para determinar a associação dos mesmos com a distribuição, concentração e resposta ao tratamento de diferentes fármacos substratos desta proteína (48).

Não há um consenso sobre a influência dos polimorfismos sobre a expressão proteica. Hoffmeyer et al. (1999) (49), encontraram que o polimorfismo 3435 TT estava associado a uma maior concentração plasmática de digoxina e a uma diminuição da

expressão proteica da P-gp no duodeno. Por sua vez, Moriya et al., (2002) (50) evidenciaram uma quantidade aumentada de mRNA da P-gp no duodeno de pacientes com genótipo TT quando comparados a outros genótipos. Contrariamente, Siegmund et al. (2002) (51), não encontraram associação entre a presença do polimorfismo e o nível de mRNA da P-gp no duodeno e entre o polimorfismo e a biodisponibilidade plasmática do talinolol.

A superexpressão da P-gp está associada à resistência ao tratamento de doenças como o câncer (52). Também tem-se demonstrado que a superexpressão de ABCB1 prediz a resistência para antiepiléticos (53), tendo sido observado que o alelo C (3435C) é o mais frequente em pacientes com epilepsia e resistentes ao tratamento, quando comparados com grupo de pacientes respondedores (48).

A resposta ao tratamento na esquizofrenia e a relação com os polimorfismos de ABCB1 são controversos. Em 2011, um estudo piloto com pacientes esquizofrênicos em tratamento com quetiapina mostrou que indivíduos com o genótipo 2677TT e 3435TT relacionavam-se com menores concentrações plasmáticas do fármaco em comparação com outros genótipos (54). Por outro lado, foi demonstrada a correlação entre o haplótipo 1236T/2677T/3435T com maiores níveis de olanzapina no plasma e no líquido cefalorraquidiano (55) e o alelo 2677T foi correlacionado com maiores concentrações plasmáticas de olanzapina em mulheres diagnosticadas com esquizofrenia (56). Dois estudos visando estabelecer a associação entre concentração plasmática de CLZ e ABCB1 foram realizados, o primeiro deles publicado em 2009 por Consolli et al. (57) e que observaram a associação entre altas concentrações de CLZ plasmática e a presença dos alelos 3435 (T) e 2677 (T) e também que os pacientes portadores dos dois alelos precisaram de uma dosagem menor de CLZ em comparação com outros pacientes. Outro estudo, realizado por Jaquenoud et al. (2009) (58), mostrou que pacientes com o genótipo 3435 TT tinham maiores concentrações plasmáticas de CLZ em comparação com outros genótipos. Contraditoriamente, Mouaffak et al., (2011) (59) não encontraram associação entre o polimorfismo 3435 e a super-refratariedade à CLZ. Semelhantemente, Takao et al., (2006) não encontraram relação entre a refratariedade ao tratamento com CLZ e os polimorfismos 2677 e 3435 de ABCB1 (60).

1.3.4. Variação étnica das frequências polimórficas

O isolamento geográfico, a migração, a introdução de novas mutações, a velocidade de crescimento de uma população, até mesmo uma catástrofe ou qualquer outro fenômeno que conduza à variabilidade genética, geram diferenças nas distribuições alélicas e genótípicas dos polimorfismos nas diferentes populações. Assim sendo, a determinação das frequências alélicas e genótípicas é uma ferramenta útil na farmacogenética, pois a identificação da associação entre um alelo ou um polimorfismo com a resposta a um medicamento e a identificação de maior presença dessa variante num grupo étnico, pode servir para prever a resposta ao tratamento nessa população, contribuindo para a escolha mais assertiva dos fármacos e das doses a serem prescritas naquela população.

Na tabela 3, é apresentado um compilado das frequências alélicas e genótípicas descritas para as populações da América, África, Ásia e Europa para os polimorfismos 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T, obtidas do banco de dados *HapMap consorcium*.

O polimorfismo 1236C>T apresenta uma maior frequência do genótipo homozigoto selvagem na população africana, enquanto o genótipo homozigoto mutado é mais frequente na população asiática. Um estudo realizado na população da Índia (61) demonstrou frequência expressiva do alelo polimórfico em homozigose, sendo este o genótipo mais frequente naquela população (48,3%). Por sua vez, o genótipo em heterozigose é o mais frequente nas populações europeias e americanas.

O polimorfismo 2677G>T/A tem três variantes alélicas, a variante A é a mais nova delas e por isso se encontra em baixa frequência na população. O genótipo homozigoto selvagem tem uma frequência quase que absoluta na população africana (96,2%) e na população asiática o genótipo mais comum é o heterozigoto (G/A ou G/T), embora o genótipo mutado (A/A, T/T ou A/T), apresente frequência significativa nesta população (23,3%).

Em relação ao polimorfismo 3435, o genótipo homozigoto selvagem apresenta frequência de 72,3% nas populações africanas. O genótipo heterozigoto é o mais comum nas populações americanas, europeias e na maioria das populações asiáticas. Algumas populações asiáticas, entretanto, apresentam o genótipo mutado (T/T) com uma elevada frequência, chegando a ser o genótipo mais comum (22).

No Brasil tem sido realizado estudos com diferentes populações (62)60-62), (tabela 4), e a maioria deles concluem que os alelos selvagens são os mais frequentes e que os genótipos heterozigotos para cada um dos três polimorfismos são os mais frequentes na população brasileira.

Diante das informações apresentadas, torna-se notório que a caracterização dos polimorfismos do gene ABCB1 é um procedimento importante para o monitoramento das frequências alélicas e genotípicas desses polimorfismos nas populações, aprimorando o conhecimento da dinâmica evolucionista e, especificamente para a área da farmacogenética, estabelecendo associações entre os polimorfismos e a resposta ao tratamento que visem à terapia direcionada aos indivíduos e às populações específicas.

Tabela 3. Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>A/T e 3435C>T em diferentes populações do mundo.

| | | Africanos (661) | Americanos (347) | Leste asiático(504) | Europa (503) | Sudeste asiático(489) |
|-------------------|-----------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| 1236C>T | C | 0,136 | 0,597 | 0,373 | 0,584 | 0,413 |
| | T | 0,864 | 0,403 | 0,627 | 0,416 | 0,587 |
| | CC | 0,744 | 0,346 | 0,157 | 0,334 | 0,172 |
| | CT | 0,239 | 0,501 | 0,433 | 0,501 | 0,483 |
| | TT | 0,017 | 0,153 | 0,411 | 0,165 | 0,346 |
| 2677G>A | G | 0,980 | 0,572 | 0,468 | 0,573 | 0,358 |
| | T | 0,020 | 0,369 | 0,398 | 0,410 | 0,592 |
| | A | 0,001 | 0,059 | 0,134 | 0,018 | 0,050 |
| | GG | 0,962 | 0,317 | 0,220 | 0,316 | 0,133 |
| | GT | 0,035 | 0,447 | 0,361 | 0,489 | 0,411 |
| | GA | 0,00 | 0,063 | 0,135 | 0,024 | 0,039 |
| | TT | 0,002 | 0,124 | 0,173 | 0,159 | 0,356 |
| | TA | 0,002 | 0,043 | 0,089 | 0,012 | 0,061 |
| | AA | 0,00 | 0,006 | 0,022 | 0,000 | 0,000 |
| | AT | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 3435C>T | C | 0,850 | 0,572 | 0,602 | 0,482 | 0,425 |
| | T | 0,150 | 0,428 | 0,398 | 0,518 | 0,575 |
| | CC | 0,723 | 0,329 | 0,377 | 0,231 | 0,192 |
| | CT | 0,254 | 0,487 | 0,450 | 0,503 | 0,466 |
| | TT | 0,023 | 0,184 | 0,173 | 0,266 | 0,342 |

Dados obtidos do catálogo de variantes genéticas HapMap, (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabela 4. Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>A/T e 3435C/T, no Brasil.

| Autor | Scheiner et al, 2010, (62). | Santos et al, 2011, (63). | Estrela et al, 2008, (64). | Gonzalez, et al 2008, (65) | Cusinato et al, 2014, (66) |
|--------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| N | 278 | 1029 | 320 | 137 | 108 |
| Localização | Rio de Janeiro | Centro Oeste, Nordeste, Sudeste, Sul | Rio de Janeiro | Porto Alegre | Ribeirão preto |
| Genótipo | | | | | |
| 1236 | | | | | |
| CC | 31 | | 44 | 37,2 | 38 |
| CT | 60 | | 40 | 50,4 | 47 |
| TT | 09 | | 16 | 12,4 | 15 |
| C | 61 | | 64 | 63 | 60 |
| T | 39 | | 36 | 37 | 40 |
| 3435 | | | | | |
| CC | 24 | 36,8 | 41 | 27,7 | 38 |
| CT | 61 | 44,8 | 46 | 55,5 | 45 |
| TT | 15 | 18,3 | 13 | 16,8 | 17 |
| C | 55 | | 63 | 55 | 60 |
| T | 45 | | 37 | 45 | 40 |
| 2677 | | | | | |
| GG | | | 51 | 38,7 | 44 |
| GT | | | 37 | 47,4 | 38 |
| TT | | | 9 | 8,8 | 13 |
| G | | | 70 | 62 | 65 |
| T | | | 30 | 36 | 33 |

2. Objetivos

2.1. Geral

- Determinar a associação entre os polimorfismos 1236C>T, 2677G>T/A e 3435 C>T do gene ABCB1 e a resposta ao tratamento com CLZ em pacientes com esquizofrenia refratária e super refratária.

2.2. Específicos

- Determinar as características genéticas dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T do gene ABCB1 na população em estudo.
- Identificar a associação entre os polimorfismos de 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T do gene ABCB1 com dados clínicos e demográficos dos pacientes em estudo.

3. Metodologia

3.1. Pacientes

Este estudo incluiu 68 pacientes diagnosticados com esquizofrenia de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Desordens Mentais - quarta edição (DSM IV –TR), os quais foram recrutados da Clínica psiquiátrica Brain Institute e Pax Clínica Psiquiátrica-Instituto de Neurociências, na cidade Goiânia-GO Brasil, sob responsabilidade do Dr. Rodrigo Bernini de Brito.

Os critérios de inclusão foram:

- Maiores de 18 anos.
- Estar em tratamento com CLZ há pelo menos um ano com dosagem estável.
- Remissão da fase aguda da doença.
- Redução mínima do 20% da pontuação inicial na escala de medição de sintomas Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS).

Os critérios de exclusão foram:

- Presença de uma enfermidade grave.
- Incapacidade mental.
- Medicação concomitante com outros medicamentos que interferem no metabolismo da CLZ, ou medicamentos que interferem com a função da proteína ABCB1.
- Dependência ao álcool ou substâncias psicoativas.
- Gravidez e lactação.

As características dos pacientes são apresentadas na tabela 5. Para avaliar a redução dos sintomas foi usada a escala breve de avaliação psiquiátrica (BPRS) de 18 itens, pontuados de 1 a 7 de forma crescente conforme a gravidade dos sintomas.

Segundo os critérios de classificação, 34 pacientes foram classificados como refratários e 34 como super refratários. O antipsicótico mais usado como co-medicação à clozapina no grupo dos super refratários foi o haloperidol (17), seguido por risperidona (3), quetiapina (3), olanzapina (2), e amiprazol (1).

Para as análises de associação com fatores sócio- demográficos foram definidas as seguintes variáveis:

- Sexo: feminino e masculino.
- Cigarro: Pacientes fumantes e pacientes não fumantes.
- Café: Pacientes consumidores e pacientes não consumidores.
- Etnia: Os pacientes foram classificados por auto identificação de acordo com a raça/cor, conforme sistema adotado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística para o último Censo Oficial do Brasil (www.ibge.gov.br/home/estatística/população/estimativa2012/)(67) em três grupos: branco, pardo e preto.

Tabela 5. Características sócio demográficas dos pacientes.

| Características sócio demográficas | |
|--|--------------|
| Idade M ± EP | 39,20 ± 9,94 |
| Sexo (F/M) | 21 / 47 |
| Tempo consumo CLZ (anos) | 2,94 ± 2,52 |
| Consumo de café (Sim/Não) | 44/24 |
| Consumo de cigarro (Sim/Não) | 27/41 |
| Grupo étnico (Branco/Pardo/Preto) | 21/38/9 |
| IMC inicial (Kg/m²) M ± SD | 25,80 ± 4,86 |
| IMC final (Kg/m²) M ± SD | 27,07 ± 4,99 |
| ER/ESR | 34/34 |

Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão da média (Idade, tempo de consumo, IMC inicial e IMC final) ou em números absolutos (Sexo, consumo de café, consumo de cigarro, grupo étnico e pacientes ER e ESR).

3.2. Análise farmacogenética

3.2.1. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de sangue ou amostras de células da mucosa bucal. Para a extração do DNA a partir do sangue total foi usado o kit

Purelink Genomic DNA[®] (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Para a extração de células da mucosa bucal foi usado o kit prepIT[®]-L2P (DNA Genotek), conforme as instruções do fabricante.

3.2.2. PCR

Para a identificação dos polimorfismos 1236C>T (rs1128503), 2677G>T/A (rs2032582) e 3435C>T (rs1045642), foram construídos os nucleotídeos iniciadores (*primers*) com o auxílio do programa Primer3 (68). Os pares de nucleotídeos iniciadores (senso e anti-senso) para cada polimorfismo e o tamanho de fragmento esperado após a amplificação são apresentados na tabela 6 e as condições de PCR são apresentados na tabela 7.

Tabela 6. Iniciadores dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>A/T, 3435C>T.

| Polimorfismo | Nucleotídeo iniciador Senso | Nucleotídeo iniciador Anti-senso | Tamanho do fragmento (pb) |
|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| 1236 C>T (rs1128503) | 5'TAT CCT GTG TCT GTG AAT TGC C 3' | 5' CCT GAC TCA CCA CAC CAA TG 3' | 370 |
| 2677 G>T/A (rs2032582) | 5' CAG GCT ATA GGT TCC AGG C 3' | 5' AGTA AGC AGT AGG GAG TAA CAA 3' | 290 |
| 3435 C>T/A (rs1045642) | 5'CAA AGA AAT AAA GCG ACT GA 3' | 5' GGA GAC CAG CCC CTT AT 3' | 279 |

Tabela 7. Condições da reação de PCR para os 1236C>T, 2677G>A/T e 3435C>T.

| Reagentes | Concentração final | Volume | Ciclagem |
|-------------------------------|--------------------|---------|---|
| Buffer 10X | 1X | 5 µl | 94°C – 2min 94°C – 1min 60°C – 1min 72°C-1,5min 72°C – 3min 4°C - α } 35 ciclos |
| DNTPs 10 mM | 200 µM | 0.4 µl | |
| Primer 20 µM | 1 µM | 2 µl | |
| MgCl ₂ 50 mM | 1,5 mM | 1.5 µl | |
| Agua | | 30.7 µl | |
| Taq Polimerase 5 unidades /ul | 1 unidade em 50 ul | 0.4 µl | |
| DNA | 5 ng /ul | 10 µl | |

3.2.3. Sequenciamento

Para a purificação das amostras foi utilizado o kit illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE healthcare) seguindo as instruções do fabricante. Para a reação de sequenciamento, foi usado o kit Big Dye[®] terminator 3.1 (Applied Biosystems, Califórnia, USA) e, posteriormente, as amostras foram analisadas pelo sequenciador ABI 3500[®] Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Califórnia, USA). As condições da reação de sequenciamento são apresentadas na tabela 8.

Tabela 8. Condições da reação de sequenciamento dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>A/T, 3435C>T.

| Reagentes | Quantidade | Ciclagem |
|--|------------|---|
| BigDye terminator v3.1 | 1,5 µl | 96°C – 10s 56°C – 5s 60°C – 4min 4°C - α |
| Buffer BigDye v.3.1 (5X) | 1,25 µl | |
| Iniciador/Primer (5 µM) | 1 µl | |
| Produto de PCR purificado (50 ng/ µl) | 1 µl | |
| Água ultrapura | 5,25 µl | } 25 ciclos |
| TOTAL | 10 µl | |

O produto da reação de sequenciamento foi precipitado segundo a metodologia de etanol gelado e EDTA 125 mM. As sequências obtidas foram analisadas com os programas BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7.2.5.0) e o programa ClustalX2 (versão 2.1). Os eletroferogramas para cada um dos polimorfismos são apresentados nas figuras 4, 5 e 6.

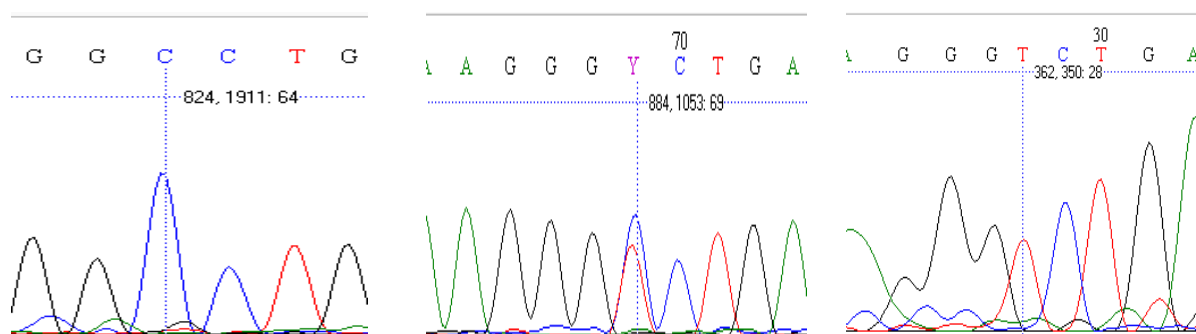


Figura 4. Eletroferograma do polimorfismo 1236C>T. Observa-se os genótipos CC, CT e TT.

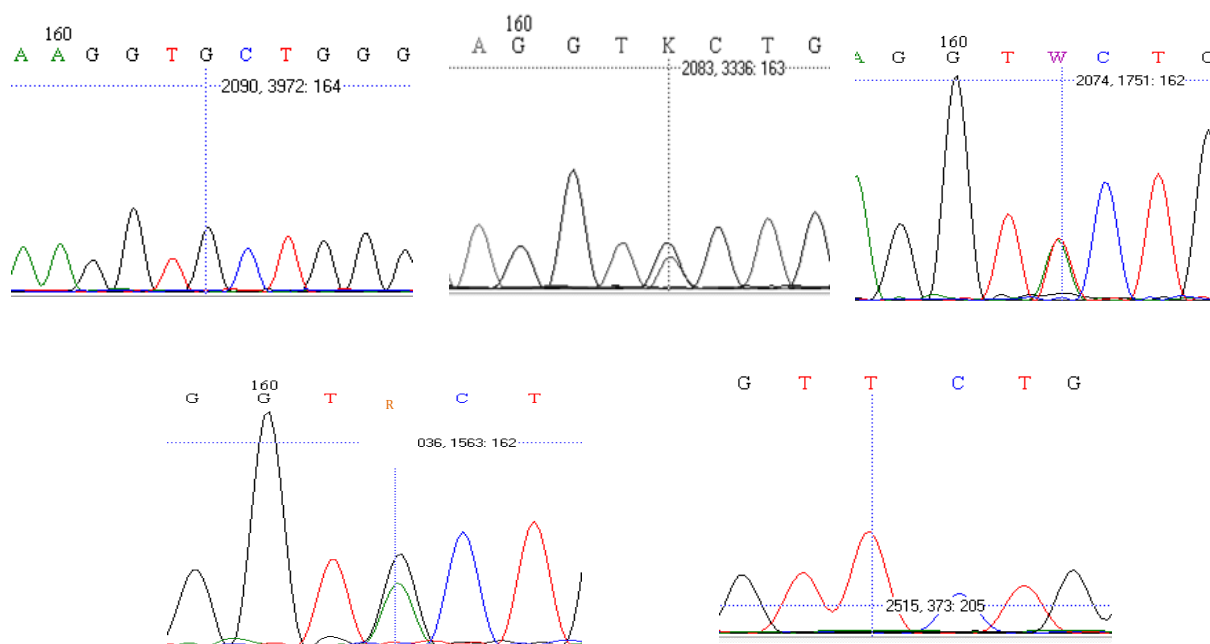


Figura 5. Eletroferograma do polimorfismo 2677G>A/T. Observa-se os genótipos GG, GT, AT, GA e TT.

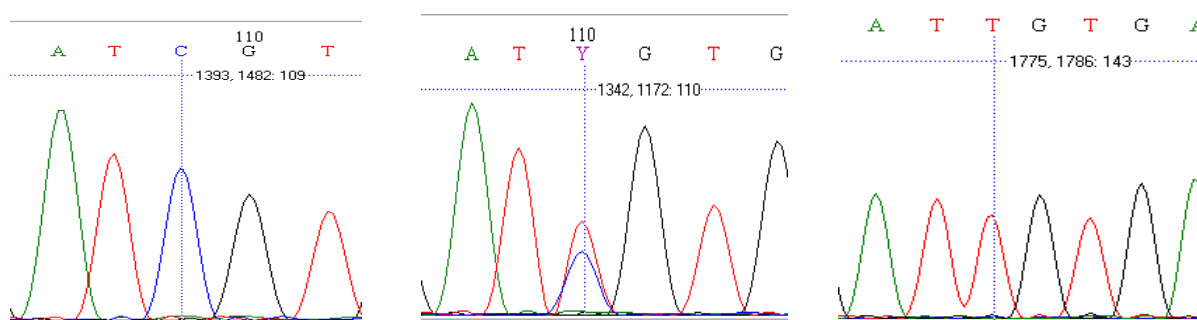


Figura 6. Eletroferograma do polimorfismo 3435C>T. Observa-se os genótipos CC, CT e TT.

3.3. Análise estatística

O desequilíbrio de ligação foi estimado pelo coeficiente de Lewontin (D') e o equilíbrio de Hardy Weinberg (HW) pelo teste exato de Fisher. As análises foram realizadas utilizando os programas Haploview versão 4.2 e Arlequin versão 3.5.1.2 respectivamente, sendo este último também utilizado para determinar os haplótipos e as frequências haplotípicas usando o método do algoritmo de máxima verossimilhança.

Para a comparação entre grupos foi realizado primeiro um teste de Kolmogorov – smirnov como estabelecer a normalidade dos dados, após, para determinar a associação entre variáveis foi usado o X^2 ou teste exato de Fisher para variáveis categóricas, Kruskal Wallis e teste de Mann Whitney U para variáveis não paramétricas contínuas, teste T-Student ou análise de variância (ANOVA) foi usada para variáveis paramétricas contínuas. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de “p” foi menor de 0,05 ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram feitas utilizando os pacotes estatísticos SPSS versão 21.0 (SPSS Inc., IL, EUA).

4. Resultados

4.1. Frequências alélicas, genóticas, equilíbrio de HW e desequilíbrio de ligação

Foi observada uma maior frequência dos alelos e dos genótipos homocigotos selvagens para os três polimorfismos (tabela 9). O polimorfismo 2677G>A/T encontra-se em desequilíbrio de Hardy Weinberg, nesse polimorfismo foi observada uma diferença entre a heterocigosidade observada (0,27) e a esperada (0,38), apresentando um menor número de heterocigotos do que o esperado. As análises mostraram um forte desequilíbrio de ligação entre os três polimorfismos ($p= 0,0001$), e um valor de p significativo quando comparados em grupos de dois polimorfismos, 1236C>T com 2677G>T/A (0,001), 2677G>T/A com 3435C>T (0,001), e 1236C>T com 3435C>T (0,001).

O valor obtido pela análise do coeficiente de Lewontin (D') foi para todas as combinações perto de 100, valor que indica o grau de ligação máxima, conforme demonstrado na figura 7.

Tabela 9. Frequências alélicas e genóticas e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

| Polimorfismo | n | % | EHW |
|--------------|-----|------|--------|
| 1236 | | | |
| CC | 38 | 55,1 | |
| CT | 23 | 33,3 | |
| TT | 7 | 10,1 | 0,23 |
| C | 100 | 73,5 | |
| T | 36 | 26,5 | |
| 2677 | | | |
| GG | 42 | 60,9 | |
| GT | 17 | 24,6 | |
| TT | 7 | 10,1 | |
| GA | 1 | 1,4 | 0,035* |
| TA | 1 | 1,4 | |
| G | 102 | 75,0 | |
| T | 32 | 23,5 | |
| A | 2 | 1,5 | |
| 3435 | | | |
| CC | 31 | 44,6 | |
| CT | 26 | 37,7 | |
| TT | 11 | 15,9 | 0,18 |
| C | 88 | 64,7 | |
| T | 48 | 35,3 | |

Teste Exato de Fisher. $p < 0,05$.

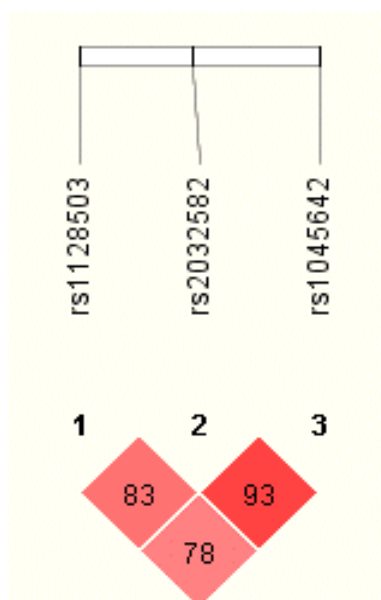


Figura 7. Desequilíbrio de ligação estimado pelo coeficiente de Lewontin (D') entre os polimorfismos 1236C>T, 2677G>A/T, 3435C/T.

4.2. Associação entre polimorfismos e a resposta terapêutica à CLZ

Inicialmente foi avaliada a média da dose de CLZ administrada e sua associação com os alelos e genótipos de cada um dos polimorfismos. Os resultados demonstraram que não há associação diferenciada entre quantidade de dose de CLZ e os diferentes genótipos em cada um dos polimorfismos de ABCB1 analisados (Tabela 10).

Tabela 10. Relação entre os polimorfismos de ABCB1 e a dosagem de CLZ (mg/dia).

| Polimorfismo | N | Dosagem \pm DP | p |
|--------------|-----|---------------------|-------|
| 1236 | | | |
| C/C | 38 | 532,89 \pm 126,42 | 0,578 |
| C/T | 23 | 569,56 \pm 149,04 | |
| T/T | 7 | 557,14 \pm 161,83 | |
| C | 100 | 544,00 \pm 133,38 | 0,487 |
| T | 36 | 558,33 \pm 146,14 | |
| 2677 | | | |
| G/G | 42 | 541,66 \pm 135,21 | 0,864 |
| G/T | 17 | 552,94 \pm 141,94 | |
| T/T | 7 | 571,42 \pm 170,43 | |
| G | 102 | 544,11 \pm 134,47 | 0,717 |
| T | 32 | 559,37 \pm 147,79 | |
| 3435 | | | |
| C/C | 31 | 548,38 \pm 128,76 | 0,869 |
| C/T | 26 | 559,61 \pm 151,00 | |
| T/T | 11 | 518,18 \pm 132,80 | |
| C | 88 | 551,70 \pm 134,21 | 0,694 |
| T | 48 | 540,62 \pm 141,66 | |

Teste de Kruskal Wallis para os genótipos com a dosagem e teste de U de Mann Whitney para o análises entre alelos e dosagem. $p < 0,05$. Os dados são apresentados como a média \pm desvio-padrão das doses de CLZ.

Para determinar a influência dos polimorfismos na resposta ao tratamento também foi analisada a porcentagem de diminuição da pontuação BRPS inicial (antes do tratamento com CLZ) com a pontuação da BPRS realizada no momento da coleta da amostra para o teste farmacogenético. Essa medida foi realizada para determinar se algum genótipo ou alelo apresentava associação com a resposta ao tratamento. Quanto maior a diminuição da pontuação da BPRS inicial para a BPRS final, maior será a porcentagem de resposta ao tratamento, sendo isto indicativo de eficácia terapêutica. Os

resultados encontrados, porém, não mostraram nenhuma associação mais significativa para algum alelo ou para algum genótipo (Tabela 11).

Tabela 11. Relação entre os polimorfismos de ABCB1 com a porcentagem (%) de variação da pontuação na escala BPRS.

| Polimorfismo | % BPRS | p |
|---------------------|---------------|----------|
| 1236 | | |
| C | 46,64 ± 22,42 | 0,969 |
| T | 43,21 ± 22,39 | |
| CC | 46,27 ± 21,57 | 0,973 |
| CT | 48,82 ± 26,02 | |
| TT | 45,10 ± 22,71 | |
| 2677 | | |
| G | 45,74 ± 22,25 | 0,716 |
| T | 51,05 ± 24,90 | 0,552 |
| GG | 43,71 ± 21,22 | |
| GT | 54,64 ± 26,31 | |
| TT | 48,16 ± 24,82 | |
| 3435 | | |
| C | 44,79 ± 22,43 | 0,147 |
| T | 51,08 ± 23,29 | 0,362 |
| CC | 42,07 ± 20,83 | |
| CT | 51,29 ± 25,44 | |
| TT | 50,85 ± 21,59 | |

Teste U de Mann Withney para comparação entre alelos e Kruskal Wallis para comparação entre genótipos. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão da média. $p < 0,05$.

Outro indicador avaliado para determinar a influência dos polimorfismos com a qualidade da reposta foi a refratariedade ao tratamento (pacientes respondedores a CLZ e não respondedores). Os resultados demonstraram que não há associação de genótipo (s) ou de alelo (s) com a refratariedade ao tratamento, não sendo observada diferenças entre os grupos refratário e super refratário (tabela 12)

Tabela 12. Relação entre os polimorfismos de ABCB1 e grupos de pacientes refratário e super refratário.

| Polimorfismo | ER | ESR | p |
|--------------|----|-----|------|
| 1236 | | | |
| C/C | 19 | 19 | |
| C/T | 13 | 10 | 0,53 |
| T/T | 2 | 5 | |
| C | 51 | 49 | |
| T | 17 | 19 | 0,85 |
| 2677 | | | |
| G/G | 19 | 23 | |
| G/T | 13 | 4 | 0,06 |
| T/T | 1 | 6 | |
| G | 52 | 50 | |
| T | 15 | 17 | 0,92 |
| 3435 | | | |
| C/C | 13 | 18 | |
| C/T | 17 | 9 | 0,13 |
| T/T | 4 | 7 | |
| C | 43 | 45 | |
| T | 25 | 23 | 0,86 |

Teste Exato de Fisher e X^2 . $p < 0,05$. Os dados são apresentados em números absolutos (pacientes refratários (ER)/pacientes super refratários (ESR)).

4.3 Análise dos haplótipos

Foi determinada a presença de 8 haplótipos por meio de análise com o algoritmo de máxima verossimilhança utilizando o software Arlequin. Os resultados demonstraram que o haplótipo mais comum é aquele que apresenta os alelos selvagens (CGC) (Tabela 13). Também, foi analisada a possível associação entre os haplótipos e a dosagem, a porcentagem de diminuição da pontuação BPRS (avaliada antes do tratamento e no momento da realização do teste farmacogenético) e a associação com a refratariedade ao tratamento com CLZ (Tabela 14). Os resultados encontrados não demonstraram nenhuma relação significativa entre os diferentes haplótipos e as variáveis acima mencionadas.

Tabela 13.Frequências haplotípicas

| Haplótipo | n | Frequência |
|------------|----|------------|
| CAC | 2 | 0,014 |
| CGC | 81 | 0,591 |
| CGT | 27 | 0,098 |
| CTT | 17 | 0,023 |
| TGC | 18 | 0,024 |
| TGT | 7 | 0,035 |
| TTC | 14 | 0,015 |
| TTT | 27 | 0,196 |

EM: Algoritmo de máxima verossimilhança.

Tabela 14.Relação entre o haplótipo e a dosagem de CLZ, % de variação da BPRS e a refratariedade ao tratamento.

| Haplótipo | Dosagem (mg/dia) | p | % BPRS | p | ER/ESR | p |
|------------|------------------|-------|---------------|-------|--------|-------|
| CAC | 550,00 ± 70,71 | | 47,40 ± 23,88 | | 1/1 | |
| CGC | 549,39 ± 135,74 | | 45,50 ± 22,80 | | 42/40 | |
| CGT | 537,50 ± 145,69 | | 52,50 ± 24,98 | | 18/10 | |
| CTT | 558,82 ± 146,02 | 0,971 | 55,90 ± 26,58 | 0,773 | 12/5 | 0,819 |
| TGC | 582,35 ± 155,06 | | 49,45 ± 27,52 | | 10/7 | |
| TGT | 571,42 ± 188,98 | | 40,50 ± 20,89 | | 4/3 | |
| TTC | 578,57 ± 152,81 | | 53,62 ± 28,47 | | 9/5 | |
| TTT | 548,14 ± 150,30 | | 52,77 ± 25,87 | | 14/13 | |

Teste de Kruskal Wallis (dosagem e % de BPRS), e X² para (ER e ESR). p<0,05. Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão da média (dosagem da CLZ e % BPRS) ou em números absolutos (ER/pacientes super refratários ESR)

4.4. Análise dos dados clínicos e sócio-demográficos em pacientes refratários e super refratários

Foram analisadas as características clínicas e sócio-demográficas entre os pacientes que responderam ao tratamento com CLZ (refratários) e os que não responderam (super refratários). A dosagem de CLZ foi maior no grupo ESR em relação ao grupo ER ($p < 0,002$) e a escala BPRS apresentou redução da pontuação significativamente maior no grupo ER em comparação com ESR ($p < 0,001$). Na distribuição dos sexos entre os dois grupos, observou-se que o número de indivíduos do sexo feminino teve um aumento expressivo no grupo ESR em relação ao ER ($p = 0,034$), assim mesmo foi observado uma diminuição de indivíduos de sexo masculino no grupo dos SER quando comparado com o grupo dos RE. Dados como o a diferença do índice de massa corporal (IMC) final (diferença dos valores antes do tratamento e no momento da coleta da amostra para a realização do teste farmacogenético), consumo de café e de cigarro e etnia não foram diferentes entre os grupos (Tabela 15).

Tabela 15. Características clínicas e sócio demográficas dos pacientes portadores de esquizofrenia refratária (ER) e super refratária (ESR).

| Variável | ER | ESR | p |
|---|---------------------|---------------------|---------|
| Dosagem (mg/dia, M \pm SD) | 495,58 \pm 138,37 | 600,00 \pm 115,47 | 0,002** |
| BPRS (% de variação \pm SD) | 59,30 \pm 24,28 | 34,73 \pm 12,85 | 0,001** |
| Diferença entre IMC (Kg/m ²) inicial e final (M \pm SD) | 1,082 \pm 2,23 | 1,47 \pm 2,33 | 0,539 |
| Idade (Anos, M \pm SD) | 40,38 \pm 10,71 | 38,03 \pm 9,12 | 0,381 |
| Sexo (Feminino/Masculino) | 6/28 | 15*/19* | 0,034* |
| Café (consumidor /não consumidor) | 10/24 | 14/20 | 0,447 |
| Cigarro (Fumante /Não fumante) | 19/15 | 22/12 | 0,310 |
| Etnia (Branco/Pardo/Preto) | 12/19/3 | 9/19/6 | 0,552 |

U de Mann Whitney (dosagem e % BPRS); T-student (IMC); Teste exato de Fisher (sexo, café e cigarro) e X² (etnia). $p < 0,05$. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão da média (dosagem % de câmbio do BPRS, diferença entre IMC inicial e final) e com valores absolutos (sexo, café, cigarro e etnia).

Sabendo que fatores sociodemográficos como idade, sexo, etnia e fatores ambientais como o consumo de café e cigarro podem influenciar na resposta ao tratamento com antipsicóticos, procurou-se avaliar a associação desses fatores com a resposta ao tratamento com CLZ, utilizando como parâmetros a dosagem de CLZ utilizada pelos pacientes e a porcentagem de variação da BPRS antes do tratamento e a última avaliação obtida no momento da coleta da amostra para a análise genotípica. Os resultados indicaram que apenas a dosagem de clozapina utilizada em indivíduos classificados na etnia de cor preta foi maior em comparação às etnias branca e parda ($p=0,02$). Os demais fatores analisados não apresentaram diferenças significativas na dosagem de clozapina administrada (Tabela 16).

Tabela 16. Associação das características sócio demográficas com a dosagem de CLZ (mg/dia) e a % de variação da BPRS.

| | | n | Dosagem CLZ (mg/dia) | p | % BPRS | p |
|----------------|----------------|----|-------------------------|-------------|----------------|------|
| Café | Consumidor | 44 | 553,40 ± 137,83 | 0,71 | 46,56 ± 22,47 | 0,75 |
| | Não consumidor | 24 | 571,42 ± 110,19 | | 43,49 ± 21,022 | |
| Cigarro | Fumante | 27 | 531,48 ± 124,92 | 0,44 | 44,92 ± 21,07 | 0,57 |
| | Não fumante | 41 | 558,53 ± 144,87 | | 48,84 ± 24,19 | |
| Sexo | Feminino | 21 | 566,66 ± 111,05 | 0,41 | 41,41 ± 22,17 | 0,27 |
| | Masculino | 47 | 539,36 ± 147,41 | | 49,52 ± 23,06 | |
| Etnia | Branco | 21 | 578,57 ± 136,53 | | 52,81 ± 27,65 | |
| | Pardo | 38 | 573,68 ± 120,09 | 0,02 | 42,69 ± 19,88 | 0,33 |
| | Preto | 9 | 600 ± 158,11* | | 51,71 ± 21,56 | |

Teste de U de Mann Whitney (consumo de café e cigarro, sexo) e Kruskal Wallis (etnia). $p < 0,05$. Os valores foram expressados como a média ± erro padrão.

Considerando a diferença encontrada na dosagem da CLZ entre os grupos étnicos, buscou-se avaliar a distribuição alélica e genotípica dos três polimorfismos de

ABCB1 entre os grupos étnicos, visando estabelecer se existe uma relação entre a diferença encontrada com o genótipo de ABCB1. Os resultados demonstraram uma diferença apenas para o alelo T no polimorfismo 3435, onde foi observada uma maior frequência alélica na etnia preta, sendo que essa diferença não se manteve quando analisados os genótipos desses indivíduos (Tabela 17).

Tabela 17. Distribuição alélica e genotípica nos grupos étnicos.

| Polimorfismo | Branco | Pardos | Pretos | p |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|----------|
| 1236 | | | | |
| C | 32 | 57 | 11 | 0,365 |
| T | 10 | 19 | 7 | |
| C/C | 13 | 23 | 2 | |
| C/T | 6 | 10 | 7 | 0.080 |
| T/T | 2 | 5 | 0 | |
| 2677 | | | | |
| G | 33 | 56 | 13 | 0.853 |
| T | 8 | 19 | 5 | |
| G/G | 14 | 23 | 5 | |
| G/T | 4 | 10 | 3 | 0.951 |
| T/T | 2 | 4 | 1 | |
| 3435 | | | | |
| C | 27 | 54 | 7* | 0.040* |
| T | 15 | 22 | 11* | |
| C/C | 9 | 20 | 2 | |
| C/T | 9 | 14 | 3 | 0.192 |
| T/T | 3 | 4 | 4 | |

Teste estatístico utilizado: X^2 , $p < 0,05$, os valores foram representados com números absolutos.

4.5. CLZ e ganho de peso

Considerando todos os pacientes do estudo (refratários e super refratários) e comparando o IMC inicial (antes de tratamento) com o IMC final (na realização do teste farmacogenético), foi observado um aumento significativo do IMC ($p= 0,001$), com uma média \pm erro padrão de $25,97 \pm 5,02$ para o IMC antes do tratamento e $27,37 \pm 5,13$ para IMC final. As análises de correlação e Spearman não demonstraram relação entre o tempo do uso de CLZ e o ganho de peso ($p= 0,089$).

5. Discussão

No presente trabalho procurou-se determinar a possível associação entre a resposta ao tratamento com CLZ e os polimorfismos 1236C>T, 2677G>A/T e 3435C>T do gene ABCB1. Foram determinados indicadores de resposta ao tratamento, sendo o primeiro deles a dosagem administrada aos pacientes, onde uma dosagem maior está associada com resposta terapêutica menos eficiente. O segundo indicador foi a % de sucesso da terapia através da escala de medição dos sintomas (BPRS), onde uma redução maior de 20% com referência à primeira avaliação antes da medicação é indicativo de sucesso na resposta ao tratamento, portanto, uma maior porcentagem de redução da escala BPRS é indicador de melhor resposta. Por último, foi realizada a comparação da distribuição alélica e genotípica entre os grupos ER (respondedores à CLZ) e ESR (não respondedores à CLZ). Além disso, foi determinada a influência de outros fatores como a idade, o sexo, o consumo de café e cigarro na resposta ao tratamento com CLZ e, adicionalmente, foram determinados alguns parâmetros genéticos populacionais, como o equilíbrio de HW, o desequilíbrio de ligação e as frequências haplotípicas, alélicas e genotípicas, visando caracterizar o grupo em estudo e compará-lo com outras populações.

Ao serem determinadas as frequências alélicas dos polimorfismos, sem estratificar por grupo étnico, foi encontrado que os alelos do tipo selvagem, para cada um dos polimorfismos, apresentaram a maior frequência. Estes dados corroboram com os obtidos por Cusinato et al. (2014) (66), onde verificaram que numa população de 108 brasileiros de Ribeirão Preto- São Paulo, o alelo selvagem “C” para os polimorfismos 1236 e 3436, foi o mais frequente (60% para ambos polimorfismos) e o alelo “G” foi o mais frequente para o polimorfismo 2677 (65%). Além disso, as frequências alélicas coincidem também com os dados da Rede Nacional de Farmacogenética (REFARGEM), onde foram genotipados 2062 indivíduos distribuídos em 4 regiões do país (nordeste, norte, sudeste e sul) (69).

Apesar da semelhança na frequência alélica, as frequências genotípicas não foram semelhantes às reportadas em outros trabalhos realizados no Brasil. De modo geral, a população deste estudo apresentou maior frequência dos genótipos homocigotos selvagens, resultado que não coincide com o reportado por Sheiner et al. (2010) (62),

que encontrou uma maior frequência do genótipo heterozigoto para os polimorfismos 1236 e 3435 numa população de 278 indivíduos do Rio de Janeiro. Também não coincide com o estudo de Santos et al. (2008) (63), que demonstrou uma maior frequência do genótipo heterozigoto para o polimorfismo 3435 nas populações descendentes de ameríndios, caucasianos e mulatos do Brasil. Por outro lado, eles são semelhantes às frequências relatadas pelo estudo de Estrela et al. (2008) (64), onde os genótipos homozigotos selvagens para os alelos 2677 e 1236 foram os mais frequentes num grupo de 320 indivíduos oriundos do estado do Rio de Janeiro.

A diferença encontrada entre os vários estudos deve-se ao alto grau de miscigenação da população brasileira, onde convergem os grupos étnicos ameríndio, europeu e africano, principalmente, sendo esse o provável motivo de não encontrar homogeneidade nos dados, até mesmo nas frequências dentro do próprio território brasileiro. No caso específico do presente estudo, parece se tratar do primeiro trabalho relatando as frequências genotípicas desses três polimorfismos numa população da região Centro-Oeste brasileira. Por outro lado, deve-se ressaltar que o tamanho amostral é pequeno para representar a população geral da região central do Brasil. Assim sendo, é importante que o estudo seja ampliado com um maior número de participantes, sendo também recomendável fazer o estudo com indivíduos saudáveis, para descartar qualquer possível influência da doença, embora não tenha sido encontrado evidências entre a presença de polimorfismos de ABCB1 e a esquizofrenia (56).

Quando foram analisadas as diferenças alélicas e genotípicas entre grupos étnicos utilizando os dados de autoclassificação declarada pelos pacientes (brancos, pretos e pardos), verificou-se que elas não são diferentes entre si. No entanto, estudo realizado por Pena et al. (2011) (68) recomendou a não utilização dessa metodologia de classificação étnica na população brasileira, uma vez que estes autores demonstraram que em indivíduos brasileiros a cor da pele não apresenta relação significativa com a estrutura genética.

Considerando os resultados obtidos para o equilíbrio de Hardy Weinberg, foi observado que somente o genótipo 2677G>T/A apresentou desequilíbrio, resultado esse também descrito por Xiang et al. (2010) (70). Na tentativa de ajustar o resultado, esses autores excluíram posteriormente o alelo A da análise, por ser considerado um alelo

recentemente introduzido na população, e passaram então a obter um valor não significativo para o desequilíbrio anteriormente encontrado. No presente estudo, porém, ao excluir os dados do alelo A, não se alterou o nível de significância. Sugere-se que isso pode ser explicado pela baixa frequência de heterozigotos do grupo amostral para o polimorfismo 2677, sendo esta (0,27) significativamente inferior à esperada (0,38).

Por outro lado, foi observado um grande desequilíbrio de ligação entre os três polimorfismos, sendo esse resultado já previamente observado em outros estudos (62, 71,72). A importância do estudo dos haplótipos deve-se ao fato de ser demonstrado a relação entre eles e a resposta a fármacos. Nesse sentido, Hung et al. (2005) (71), encontrou a associação entre os haplótipos CGC, TGC e TTT com a resistência ao tratamento da epilepsia. Por sua vez, Johne et al. (2002) (72), demonstraram a associação do haplótipo GT dos polimorfismos 2677 e 3435 com altas concentrações plasmáticas da digoxina. No presente estudo, apesar do desequilíbrio de ligação entre os três polimorfismos, não foi estabelecida a relação entre um determinado haplótipo e a resposta ao tratamento com clozapina.

Em outra vertente de análise e, como objetivo principal desse estudo, verificou-se a associação entre a resposta ao tratamento à CLZ e os polimorfismos 1236C>T, 2677G>A/T e 3435C>T da proteína de transporte ABCB1 ou, em outras palavras, procurou-se identificar se existe diferença na distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos entre os indivíduos que respondem (ER) e os que não respondem ao tratamento com CLZ (ESR).

Na literatura científica há estudos realizados visando determinar a associação dos polimorfismos ABCB1 com a concentração plasmática dos fármacos e com a resposta ao tratamento. Jaquenoud Sirot et al. (2009) (58), reportaram que indivíduos com o genótipo 3435TT apresentam maiores concentrações plasmáticas de CLZ e que os polimorfismos 2677 e 1236 não possuem relação com os níveis plasmáticos de CLZ. Consoli et al. (2009) (57), demonstraram que os genótipos homozigotos selvagens 3435CC e 2677GG estão associados com menor concentração plasmática de CLZ e de que o alelo 1236 não influencia nos níveis plasmáticos de CLZ. Considerando também a associação dos polimorfismos com outros ASGs, foi demonstrado que o genótipo homozigoto mutado

3435TT está associado com menores concentrações plasmáticas de quetiapina (60), resultado contraditório ao encontrado com a CLZ.

Nos estudos realizados com o objetivo de avaliar a associação entre os polimorfismos de ABCB1 e a refratariedade ao tratamento na esquizofrenia, porém, não foi demonstrada qualquer relação entre os mesmos (59,60). Corroborando com esses estudos, os resultados do presente trabalho não mostraram associação entre os polimorfismos 1236 C>T, 2677 G>A/T e 3435 G>A/T com a dosagem de CLZ, % de redução da escala BPRS e a refratariedade ao tratamento. Sendo assim, apesar de ter sido demonstrada a associação entre os polimorfismos do gene ABCB1 com as concentrações plasmáticas de CLZ, eles não parecem influenciar na resposta ao tratamento.

Reforçando os resultados aqui encontrados, é preciso considerar de que existem estudos na literatura demonstrando a influência de ambos os genes ABCB1 e CYP1A2 nas concentrações plasmáticas da CLZ (57, 58) e de que, estudo recente realizado com a mesma amostra de pacientes do presente trabalho, mostrou a associação do polimorfismo CYP1A2*1F com a super refratariedade ao tratamento na esquizofrenia(73). Sendo assim, é notório sugerir de que a influência dos polimorfismos de ABCB1, diferentemente do que foi observado para o gene CYP1A2, não são significativos a ponto de interferir na resposta ao tratamento.

Outro resultado do presente trabalho, foi o aumento da proporção de pacientes do sexo feminino no grupo ESR em relação ao grupo ER, e a menor presença de indivíduos de sexo masculino no grupo de ESR quando comparada com o grupo ER. Trabalhos anteriores indicam uma maior concentração de CLZ sérica em pacientes do sexo feminino quando comparadas com pacientes do sexo masculino (24, 25). Nielsen et al. (2012) (74), por sua vez, relatou que pacientes do sexo feminino estavam associados com menor resposta à CLZ quando comparados com pacientes do sexo masculino. De modo sugestivo, porém ainda por ser confirmado, os dados do presente estudo apontam evidências que corroboram com o reportado por Nielsen et al. (2012) (74).

No que concerne à dosagem de CLZ nos diferentes grupos étnicos, não foram encontradas diferenças significativas na concentração plasmática entre pacientes esquizofrênicos das etnias preta, latina e branca residentes no estado da Flórida -

Estados Unidos da América (75). Por outro lado, Kelly et al. (2006) (76), encontraram que pacientes afrodescendentes requerem menor dosagem de CLZ em comparação com pacientes brancos. Diferentemente, neste estudo, os pacientes que se autodeclararam de etnia preta, apresentaram uma maior quantidade de dose administrada de CLZ, no entanto, os estudos seguiram metodologias diferentes, enquanto os anteriores observaram as concentrações plasmáticas, o presente estudo analisou as doses de CLZ administradas aos pacientes. Além disso, deve-se considerar o alto grau de miscigenação na população brasileira, sendo a classificação pela auto declaração um fator que pode ter interferido, por exemplo, colocando indivíduos com maior componente genético branco ou pardo no grupo preto. Além disso, embora estatisticamente diferente, a diferença da dose de CLZ entre os grupos étnicos não foi demasiadamente diferente, não sendo relevante do ponto de vista clínico.

Sabe-se que fatores como o consumo de café e cigarro apresentam uma maior prevalência em indivíduos esquizofrênicos e que estes fatores também podem influenciar na resposta ao tratamento com CLZ (25). Entretanto, os resultados aqui obtidos não evidenciaram a influência desses fatores na dose de CLZ utilizada nem na gravidade sintomatológica nos diferentes grupos analisados, indicando que o consumo do café e de cigarro são fatores que não estão associados à falência da resposta ao tratamento com CLZ.

Por fim, como resultados adicionais além dos objetivos do estudo, foi encontrado o aumento do IMC nos pacientes após o início do tratamento com CLZ. A associação do uso da CLZ e o aumento de peso já é bem estabelecido na literatura (30), sendo que os mecanismos que ocasionam tal efeito ainda não são conhecidos. Assim sendo, o resultado aqui encontrado está em consonância com os estudos anteriores que indicam a relação direta entre o aumento de peso em pacientes esquizofrênicos e o tratamento com CLZ.

6. Conclusões

Os parâmetros genéticos mostraram a maior frequência dos alelos e dos genótipos homocigotos selvagens. Além disso, foi observado o desequilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo 2677G>T/A e também a existência de desequilíbrio de ligação entre os três polimorfismos. Esses resultados configuram como os primeiros dados a serem relatados na população goiana e indicam que os mesmos deverão ser melhor definidos com a ampliação do tamanho amostral.

Em relação aos testes farmacogenéticos, os principais resultados evidenciaram que:

- ✓ Não há diferença na distribuição alélica e genotípica dos três polimorfismos entre os grupos refratário e super refratário ao tratamento.
- ✓ Não há associação entre a distribuição alélica e genotípica de qualquer dos polimorfismos com a dosagem de CLZ e a gravidade sintomatológica da esquizofrenia.
- ✓ Fatores como consumo de café e de cigarro, idade e etnia não influenciam na resposta ao tratamento com CLZ.

Conclui-se de que não há influência dos polimorfismos 1236C>T, 2677G>A/T e 3435C>T na resposta ao tratamento com CLZ e, portanto, que os mesmos não são associados com a esquizofrenia super refratária.

7. Referências bibliográficas

1. Millier A, Schmidt U, Angermeyer MC, Chauhan D, Murthy V, Toumi M, Cadi-Soussi N. Humanistic burden in schizophrenia: a literature review. *Journal of psychiatric research* 2014 Jul;54:85-93.
2. van Os J, Kenis G, Rutten BP. The environment and schizophrenia. *Nature* 2010 Nov 11;468(7321):203-212.
3. Chen J, Cao F, Liu L, Wang L, Chen X. Genetic studies of schizophrenia: an update. *Neuroscience bulletin* 2015 Feb;31(1):87-98.
4. Abdolmaleky HM, Thiagalingam S. Can the schizophrenia epigenome provide clues for the molecular basis of pathogenesis? *Epigenomics* 2011 Dec;3(6):679-683.
5. Hultman CM, Sparen P, Takei N, Murray RM, Cnattingius S. Prenatal and perinatal risk factors for schizophrenia, affective psychosis, and reactive psychosis of early onset: case-control study. *Bmj* 1999 Feb;;318(7181):421-426.
6. Cole JC, Green Bernacki C, Helmer A, Pinninti N, O'Reardon J P. Efficacy of Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) in the Treatment of Schizophrenia: A Review of the Literature to Date. *Innovations in clinical neuroscience* 2015 Jul-Aug;12(7-8):12-19.
7. Murray RM, Lappin J, Di Forti M. Schizophrenia: from developmental deviance to dopamine dysregulation. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 2008 Aug;18 Suppl 3:S129-134.
8. Laruelle M. Schizophrenia: from dopaminergic to glutamatergic interventions. *Current opinion in pharmacology* 2014 Feb;14:97-102.
9. Laruelle M, Kegeles LS, Abi-Dargham A. Glutamate, dopamine, and schizophrenia: from pathophysiology to treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003 Nov;1003:138-158.
10. Hu W, MacDonald ML, Elswick DE, Sweet RA. The glutamate hypothesis of schizophrenia: evidence from human brain tissue studies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2015 Mar;1338:38-57.
11. O'Connor WT, O'Shea SD. Clozapine and GABA transmission in schizophrenia disease models: establishing principles to guide treatments. *Pharmacology & therapeutics* 2015 Jun;150:47-80.
12. Matsumoto I, Inoue Y, Iwazaki T, Pavey G, Dean B. 5-HT_{2A} and muscarinic receptors in schizophrenia: a postmortem study. *Neuroscience letters* 2005 May 13;379(3):164-168.

13. Pakpoor J, Agius M. A review of the adverse side effects associated with antipsychotics as related to their efficacy. *Psychiatria Danubina* 2014 Nov;26 Suppl 1:273-284.
14. Haddad PM, Sharma SG. Adverse effects of atypical antipsychotics : differential risk and clinical implications. *CNS drugs* 2007 21(11):911-936.
15. Grundmann M, Kacirova I, Urinovska R. Therapeutic drug monitoring of atypical antipsychotic drugs. *Acta pharmaceutica* 2014 Dec;64(4):387-401.
16. Bersani FS, Capra E, Minichino A, Pannese R, Girardi N, Marini I, Delle Chiaie R, Biondi M. Factors affecting interindividual differences in clozapine response: a review and case report. *Human psychopharmacology* 2011 Apr;26(3):177-187.
17. Wenthur CJ, Lindsley CW. Classics in chemical neuroscience: clozapine. *ACS chemical neuroscience* 2013 Jul 17;4(7):1018-1025.
18. Javitt DC, Duncan L, Balla A, Sershen H. Inhibition of system A-mediated glycine transport in cortical synaptosomes by therapeutic concentrations of clozapine: implications for mechanisms of action. *Molecular psychiatry* 2005 Mar;10(3):275-287.
19. Arranz MJ, Rivera M, Munro JC. Pharmacogenetics of response to antipsychotics in patients with schizophrenia. *CNS drugs* 2011 Nov 1;25(11):933-969.
20. Brennan MD. Pharmacogenetics of second-generation antipsychotics. *Pharmacogenomics* 2014 Apr;15(6):869-884.
21. Kohlrausch FB. Pharmacogenetics in schizophrenia: a review of clozapine studies. *Revista brasileira de psiquiatria* 2013 Jul-Sep;35(3):305-317.
22. Lane HY, Chang YC, Chang WH, Lin SK, Tseng YT, Jann MW. Effects of gender and age on plasma levels of clozapine and its metabolites: analyzed by critical statistics. *The Journal of clinical psychiatry* 1999 Jan;60(1):36-40.
23. Tang YL, Mao P, Li FM, Li W, Chen Q, Jiang F, Cai ZJ, Mitchell PB. Gender, age, smoking behaviour and plasma clozapine concentrations in 193 Chinese inpatients with schizophrenia. *British journal of clinical pharmacology* 2007 Jul;64(1):49-56.
24. Spina E, de Leon J. Metabolic drug interactions with newer antipsychotics: a comparative review. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2007 Jan;100(1):4-22.
25. Hagg S, Spigset O, Mjorndal T, Dahlqvist R. Effect of caffeine on clozapine pharmacokinetics in healthy volunteers. *British journal of clinical pharmacology* 2000 Jan;49(1):59-63.

26. Djordjevic N, Ghotbi R, Bertilsson L, Jankovic S, Aklillu E. Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption in Serbs and Swedes. *European journal of clinical pharmacology* 2008 Apr;64(4):381-385.
27. Hasegawa M, Gutierrez-Esteinou R, Way L, Meltzer HY. Relationship between clinical efficacy and clozapine concentrations in plasma in schizophrenia: effect of smoking. *Journal of clinical psychopharmacology* 1993 Dec;13(6):383-390.
28. Meyer JM. Individual changes in clozapine levels after smoking cessation: results and a predictive model. *Journal of clinical psychopharmacology* 2001 Dec;21(6):569-574.
29. Tsuda Y, Saruwatari J, Yasui-Furukori N. Meta-analysis: the effects of smoking on the disposition of two commonly used antipsychotic agents, olanzapine and clozapine. *BMJ open* 2014 4(3):1-9.
30. Whitney Z, Procyshyn RM, Fredrikson DH, Barr AM. Treatment of clozapine-associated weight gain: a systematic review. *European journal of clinical pharmacology* 2015 Apr;71(4):389-401.
31. Leucht S, Cipriani A, Spineli L, Mavridis D, Orey D, Richter F, Samara M, Barbui C, Engel RR, Geddes JR, Kissling W, Stapf MP, Lassig B, Salanti G, Davis JM. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet* 2013 Sep 14;382(9896):951-962.
32. Peuskens J. The evolving definition of treatment resistance. *The Journal of clinical psychiatry* 1999 60 Suppl 12:4-8.
33. Elkis H, Meltzer HY. [Refractory schizophrenia]. *Revista brasileira de psiquiatria* 2007 Oct;29 Suppl 2:S41-47.
34. Miyamoto S, Jarskog LF, Fleischhacker WW. Schizophrenia: when clozapine fails. *Current opinion in psychiatry* 2015 May;28(3):243-248.
35. Sommer IE, Begemann MJ, Temmerman A, Leucht S. Pharmacological augmentation strategies for schizophrenia patients with insufficient response to clozapine: a quantitative literature review. *Schizophrenia bulletin* 2012 Sep;38(5):1003-1011.
36. Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer research* 1970 Apr;30(4):1174-1184.
37. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica acta* 1976 Nov 11;455(1):152-162.
38. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Pohlack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987 Jan;84(1):265-269.

39. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987 Nov;84(21):7735-7738.
40. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2004 Jan;75(1):13-33.
41. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 2008 Jul;38(7-8):802-832.
42. Sharom FJ. Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function. *Frontiers in oncology* 2014 Mar 4:41.
43. Cascorbi I. P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handbook of experimental pharmacology* 2011 (201):261-283.
44. Schmitt U, Kirschbaum KM, Poller B, Kusch-Poddar M, Drewe J, Hiemke C, Gutmann H. In vitro P-glycoprotein efflux inhibition by atypical antipsychotics is in vivo nicely reflected by pharmacodynamic but less by pharmacokinetic changes. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 2012 Aug;102(2):312-320.
45. Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ. Characterization of the human MDR1 gene. *The AAPS journal* 2005 7(1):E1-5.
46. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, Altman RB. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenetics and genomics* 2011 Mar;21(3):152-161.
47. Meletiadiis J, Chanock S, Walsh TJ. Human pharmacogenomic variations and their implications for antifungal efficacy. *Clinical microbiology reviews* 2006 Oct;19(4):763-787.
48. Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinkmann U, Smith A, Goldstein DB, Wood NW, Sisodiya SM. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *The New England journal of medicine* 2003 Apr 10;348(15):1442-1448.
49. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000 Mar 28;97(7):3473-3478.

50. Moriya Y, Nakamura T, Horinouchi M, Sakaeda T, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Gotoh A, Fujimoto S, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K. Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2002 Oct;25(10):1356-1359.
51. Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, Dazert P, Schroeder E, Sperker B, Warzok R, Kroemer HK, Cascorbi I. The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2002 Nov;72(5):572-583.
52. Qiu JG, Zhang YJ, Li Y, Zhao JM, Zhang WJ, Jiang QW, Mei XL, Xue YQ, Qin WM, Yang Y, Zheng DW, Chen Y, Wei MN, Shi Z. Trametinib modulates cancer multidrug resistance by targeting ABCB1 transporter. *Oncotarget* 2015 Jun 20;6(17):15494-15509.
53. Tishler DM, Weinberg KI, Hinton DR, Barbaro N, Annett GM, Raffel C. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 1995 Jan;36(1):1-6.
54. Nikisch G, Baumann P, Oneda B, Kiessling B, Weisser H, Mathe AA, Yoshitake T, Kehr J, Wiedemann G, Eap CB. Cytochrome P450 and ABCB1 genetics: association with quetiapine and norquetiapine plasma and cerebrospinal fluid concentrations and with clinical response in patients suffering from schizophrenia. A pilot study. *Journal of psychopharmacology* 2011 Jul;25(7):896-907.
55. Skogh E, Sjodin I, Josefsson M, Dahl ML. High correlation between serum and cerebrospinal fluid olanzapine concentrations in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder medicating with oral olanzapine as the only antipsychotic drug. *Journal of clinical psychopharmacology* 2011 Feb;31(1):4-9.
56. Bozina N, Kuzman MR, Medved V, Jovanovic N, Sertic J, Hotujac L. Associations between MDR1 gene polymorphisms and schizophrenia and therapeutic response to olanzapine in female schizophrenic patients. *Journal of psychiatric research* 2008 Jan;42(2):89-97.
57. Consoli G, Lastella M, Ciapparelli A, Catena Dell'Osso M, Ciofi L, Guidotti E, Danesi R, Dell'Osso L, Del Tacca M, Di Paolo A. ABCB1 polymorphisms are associated with clozapine plasma levels in psychotic patients. *Pharmacogenomics* 2009 Aug;10(8):1267-1276.
58. Jaquenoud Sirot E, Knezevic B, Morena GP, Harenberg S, Oneda B, Crettol S, Ansermot N, Baumann P, Eap CB. ABCB1 and cytochrome P450 polymorphisms: clinical pharmacogenetics of clozapine. *Journal of clinical psychopharmacology* 2009 Aug;29(4):319-326.
59. Mouaffak F, Kebir O, Picard V, Bonhomme-Faivre L, Millet B, Olie JP, Reynaud M, Krebs MO, Benyamina A. Ultra-resistant schizophrenia is not associated with the

multidrug-resistant transporter 1 (MDR1) gene rs1045642 variant. *Journal of clinical psychopharmacology* 2011 Apr;31(2):236-238.

60. Takao T, Tachikawa H, Kawanishi Y, Katano T, Sen B, Homma M, Kohda Y, Mizukami K, Asada T. Association of treatment-resistant schizophrenia with the G2677A/T and C3435T polymorphisms in the ATP-binding cassette subfamily B member 1 gene. *Psychiatric genetics* 2006 Apr;16(2):47-48.

61. Chowbay B, Cumaraswamy S, Cheung YB, Zhou Q, Lee EJ. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics* 2003 Feb;13(2):89-95.

62. Scheiner MA, Damasceno AM, Maia RC. ABCB1 single nucleotide polymorphisms in the Brazilian population. *Molecular biology reports* 2010 Jan;37(1):111-118.

63. Santos PC, Soares RA, Santos DB, Nascimento RM, Coelho GL, Nicolau JC, Mill JG, Krieger JE, Pereira AC. CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. *BMC medical genetics* 2011 12:13.

64. Estrela RC, Ribeiro FS, Carvalho RS, Gregorio SP, Dias-Neto E, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. Distribution of ABCB1 polymorphisms among Brazilians: impact of population admixture. *Pharmacogenomics* 2008 Mar;9(3):267-276.

65. Gonzalez TP, Mucenic T, Brenol JC, Xavier RM, Schiengold M, Chies JA. ABCB1 C1236T, G2677T/A and C3435T polymorphisms in systemic lupus erythematosus patients. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 2008 Sep;41(9):769-772.

66. Cusinato DA, Lacchini R, Romao EA, Moyses-Neto M, Coelho EB. Relationship of CYP3A5 genotype and ABCB1 diplotype to tacrolimus disposition in Brazilian kidney transplant patients. *British journal of clinical pharmacology* 2014 Aug;78(2):364-372.

67. Staff PO. Correction: Exploring the distribution of genetic markers of pharmacogenomics relevance in Brazilian and Mexican populations. *PloS one* 2015 10(3):e0122161.

68. Primer3 V, <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>.

69. Rede Nacional de Farmacogenetica r, <http://www.refargen.org.br/>, 2015.

70. Xiang Q, Zhao X, Zhou Y, Duan JL, Cui YM. Effect of CYP2D6, CYP3A5, and MDR1 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of risperidone and its active moiety. *Journal of clinical pharmacology* 2010 Jun;50(6):659-666.

71. Hung CC, Tai JJ, Lin CJ, Lee MJ, Liou HH. Complex haplotypic effects of the ABCB1 gene on epilepsy treatment response. *Pharmacogenomics* 2005 Jun;6(4):411-417.
72. Johne A, Kopke K, Gerloff T, Mai I, Rietbrock S, Meisel C, Hoffmeyer S, Kerb R, Fromm MF, Brinkmann U, Eichelbaum M, Brockmoller J, Cascorbi I, Roots I. Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2002 Nov;72(5):584-594.
73. De Brito R. Farmacogenética em psiquiatria: Influência dos polimorfismos CYP1A2*1F e CYP2C19*17 na refratariedade ao tratamento a clozapina e ao escitalopram. Goiânia-Goiás. Tese [Doutorado em Ciências Biológicas]- Universidade Federal de Goiás;2015.
74. Nielsen J, Nielsen RE, Correll CU. Predictors of clozapine response in patients with treatment-refractory schizophrenia: results from a Danish Register Study. *Journal of clinical psychopharmacology* 2012 Oct;32(5):678-683.
75. Horvitz-Lennon M, Donohue JM, Lave JR, Alegria M, Normand SL. The effect of race-ethnicity on the comparative effectiveness of clozapine among Medicaid beneficiaries. *Psychiatric services* 2013 Mar 1;64(3):230-237.
76. Kelly DL, Dixon LB, Kreyenbuhl JA, Medoff D, Lehman AF, Love RC, Brown CH, Conley RR. Clozapine utilization and outcomes by race in a public mental health system: 1994-2000. *The Journal of clinical psychiatry* 2006 Sep;67(9):1404-1411.